

Закрытое акционерное общество «Вектор-Бест»

Г.Е. Яковлева

**ФЕРМЕНТЫ
В КЛИНИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ**

Пособие для врачей

Новосибирск
2005

ПРЕДИСЛОВИЕ

В практике современной клинической биохимии ферменты занимают ведущее место. Одни из них используют в ферментативных наборах реагентов для определения субстратов. В сыворотке пациентов определяют активность других. Третьи входят в состав контрольных материалов и контрольных сывороток.

Цель данного пособия – помочь практическому врачу-лаборанту избежать ошибок при работе с ферментами и обеспечить тем самым высокую правильность и воспроизводимость результатов анализов. В связи с этим в пособии собраны основные сведения об общих закономерностях действия ферментов и их свойствах, рассмотрены абсорбционные методы определения активности ферментов и ферментативные методы определения субстратов, наиболее широко используемые в коммерческих наборах реагентов, присутствующих на российском рынке и применяемых в отечественной клинической биохимии. Особое внимание в пособии уделено правилам работы с ферментами и возможным источникам ошибок.

Г.Е. Яковлева. Ферменты в клинической биохимии. – Новосибирск: «Вектор-Бест», 2005. – 44 с.

В пособии описаны важнейшие свойства и закономерности действия ферментов, а также наиболее распространенные методы определения активности ферментов и ферментативные методы определения субстратов, лежащие в основе современных наборов реагентов для клинической биохимии. Сформулированы правила работы с ферментами.

Для практических врачей-лаборантов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

| | |
|--------------------------|---|
| 2,4-ДНФГ | – 2,4-динитрофенилгидразин |
| 3,5-ДХГБС | – 3,5-дихлор-2-гидроксibenзолсульфонат |
| 4-ААП | – 4-аминоантипирин |
| Г-6-ФДГ | – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа |
| ГД | – глицерол-3-фосфатдегидрогеназа |
| КИГ | – креатининиминогидролаза |
| ЛВП-холестерин | – липопротеиды высокой плотности |
| ЛНП | – липопротеиды низкой плотности |
| ЛОНП | – липопротеиды очень низкой плотности |
| МДГ | – малатдегидрогеназа |
| НАД (НАДН) | – никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная форма) |
| НАДФ (НАДФН) | – никотинамидадениндинуклеотидфосфат (восстановленная форма) |
| УМФ | – уридинмонофосфат |
| УФ | – ультрафиолет |
| ФАД (ФАДН ₂) | – флавинадениндинуклеотид (восстановленная форма) |
| ФМН | – флавиномононуклеотид |
| АМФ | – циклический аденозинмонофосфат |
| ЩФ | – щелочная фосфатаза |
| СНР | – хлор-нитрофенол |
| СНР-G ₂ | – 2-хлор-4-нитрофенил- α ,D-мальтозид |
| СНР-G ₃ | – 2-хлор-4-нитрофенил- α ,D-мальтотриозид |
| EPS | – 4,6-этилиден(G ₇)-p-нитрофенил-(G ₁)- α ,D-мальтогептаозид |
| ЕТ-G ₂ | – 4,6-этилиден(G ₂)-мальтозид |
| ЕТ-G ₃ | – 4,6-этилиден(G ₃)-мальтотриозид |
| ЕТ-G ₅ | – 4,6-этилиден(G ₅)-мальтопентаозид |
| G | – глюкоза |
| G ₂ -p-NP | – 4-нитрофенил(G ₁)- α ,D-мальтозид |
| G ₃ -p-NP | – 4-нитрофенил(G ₁)- α ,D-мальтотриозид |
| G ₄ -p-NP | – 4-нитрофенил(G ₁)- α ,D-мальтотетраозид |
| HEPES | – N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновая кислота) натриевая соль |
| PIPES | – пиперазин-1,4-бис(2-этансульфоновая кислота) динатриевая соль |
| p-NP | – пара-нитрофенол |
| p-NPP | – пара-нитрофенилфосфат |

1. ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА И ЗАКОНОМЕРНОСТИ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Для организации правильной работы с ферментами (будь то определение анализа ферментативными методами, определение ферментативной активности или работа с контрольными материалами, содержащими ферменты) необходимо знать их общие свойства и закономерности действия. Поэтому представляется целесообразным сделать краткий экскурс в энзимологию – науку о ферментах – и остановиться на основных понятиях и терминах, используемых в этой области знания.

Ферменты – это специфические высокоэффективные биологические катализаторы, синтезируемые живыми клетками. Их еще называют энзимы от греческого «en zyme» – «в дрожжах». Именно в дрожжах они были впервые обнаружены. В живом организме ферменты играют чрезвычайно важную роль, так как они участвуют во всех химических процессах, протекающих как в отдельной клетке, так и в организме в целом. Почти все они функционируют внутри тех клеток, в которых синтезируются, за исключением ферментов органов пищеварения и отдельных энзимов плазмы крови.

Ферменты представляют собой белки с молекулярными массами от 9 до 1000 кДа. Они могут быть построены из одной или нескольких полипептидных цепей, имеют, как правило, глобулярную трехмерную конформацию и состоят из одной или нескольких субъединиц (табл. 1).

В состав ферментов входят и небелковые компоненты, получившие название *кофакторов*. Это ионы металлов Ca⁺⁺, Zn⁺⁺, Fe⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Cu⁺⁺, Cl⁻. В состав ферментов также входят небольшие органические молекулы, производные витаминов (НАД, НАДН, ФАД, ФМН, перидоксальфосфат и т. п.), их называют *коферментами*. Взаимодействие кофермента с белковым ферментом (апоферментом) отличается высокой специфичностью. Кофакторы участвуют в стабилизации третичной и четвертичной структуры ферментов, связывании их с субстратом и непосредственно в ферментативном катализе. Коферменты участвуют в катализе, осуществляя, например, перенос электронов, ионов водорода, CO₂ и ряда химических групп (амино, ацильных и т. п.).

Таблица 1

Некоторые ферменты, используемые в диагностических наборах, и их характеристики

| Наименование фермента, шифр | Источник | Молекулярная масса, кДа | Кол-во субъединиц |
|---|--|-------------------------|-------------------|
| Глюкозооксидаза, 1.1.3.4. | <i>Aspergillus niger</i> | 150 | 2 |
| Пероксидаза, 1.11.1.7 | корневища хрена | 40 | 1 |
| Холестеринэстераза, 3.1.1.13 | поджелудочная железа крупного рогатого скота | 69 | 1 |
| Холестериноксидаза, 1.1.3.6 | <i>Streptomyces lavendulea</i> | 55 | 1 |
| Уреаза, 3.5.1.5 | бобы канавалии мечевидной | 480 | 4 |
| Уриказы, 1.7.7.3 | печень свиньи | 100 | 4 |
| Липопроteinлипаза, 3.1.1.34 | <i>Pseudomonas sp.</i> | 33 | 1 |
| Глицеролкиназа, 2.7.1.30 | <i>E. coli</i> | 220 | 4 |
| Глицерофосфатоксидаза, 1.1.3.21 | <i>Aerococcus sp.</i> | 70 | 2 |
| Малатдегидрогеназа, 1.1.1.37 | митохондрии сердца свиньи | 70 | 2 |
| Лактатдегидрогеназа, 1.1.1.27 | мышцы свиньи | 140 | 4 |
| Глутаматдегидрогеназа, 1.4.1.3 | микробного происхождения | 220 | 1 |
| Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, 1.1.1.49 | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | 110 | 8 |
| Гексокиназа, 2.7.1.1 | дрожжи | 100 | |

Ферменты являются высокоэффективными катализаторами, они способны увеличивать скорость химической реакции в миллионы и миллиарды раз. Так, например, уреазы ускоряет гидролиз мочевины в 10^{14} раз. Без участия ферментов химические реакции в живом организме протекают настолько медленно, что практически не оказывают влияния на его метаболизм.

Некоторые ферменты существуют в виде нескольких изоформ (изоферментов). *Изоферменты* – это ферменты из одного источника, катализирующие одну и ту же реакцию, но несколько отличающиеся по своему аминокислотному составу, вследствие

чего они могут иметь различный молекулярный вес и электрофоретическую подвижность, а также отличаться по своим иммунологическим и биохимическим характеристикам. В связи с этим они могут иметь различный рН-оптимум, отличаться по стабильности, способам регуляции и т. д. Например, хорошо известно, что лактатдегидрогеназа (ЛДГ) имеет 5 изоформ. Все они тетрамеры, состоящие из различных комбинаций двух типов субъединиц. Креатинкиназа (КК) включает две субъединицы и имеет соответственно 3 изоформы. Органы и ткани имеют характерный для них набор изоферментов. Распределение изоферментов ЛДГ, КК, α -амилазы в сыворотке крови важно при диагностике ряда заболеваний. В настоящее время известно около 100 ферментов, имеющих изоформы.

Некоторые ферменты из одного источника, катализирующие одну и ту же реакцию, идентичные по своему аминокислотному составу, могут различаться конформационно. В таких случаях говорят о множественных формах фермента. Так, L-глутаматдегидрогеназа имеет множественные формы, к ним относятся и комплексные формы ферментов (ассоциации ЩФ, γ -глутамилтрансфераза с ЛП-Х).

Вещества, с которыми происходит химическое превращение под действием ферментов, называют *субстратами*. Субстратами ферментов могут быть как природные, так и химически синтезированные вещества. Фермент может иметь один или несколько субстратов близких по строению.

Ферменты обладают каталитической активностью, т. е. способностью превращать в продукт определенное количество молекул субстрата в единицу времени, оставаясь при этом неизменными. Разные ферменты могут осуществлять от 1 до 10^6 циклов превращений субстрата в секунду. Например, 1 моль трипсина осуществляет 10^2 таких циклов в секунду, глюкозооксидаза – $17 \cdot 10^3$, а карбоангидраза – $6 \cdot 10^5$ циклов в секунду.

Существуют соединения, которые приводят фермент в каталитически активное состояние, – это *активаторы ферментов*. Ими могут быть, например, ионы двухвалентных металлов: Cu^{++} , Mg^{++} , Zn^{++} , Ca^{++} .

Другие вещества тормозят действие ферментов, снижают их каталитическую активность – это *ингибиторы ферментов*. Ингибирование может быть обратимым и необратимым, в первом слу-

чае активность фермента восстанавливается, во втором не восстанавливается (фермент инактивируется). Необратимые ингибиторы часто разрушают структуру ферментов, ими могут быть, например, катионы тяжелых металлов. Ингибиторы могут быть конкурентными (похожими на субстрат) и неконкурентными (не похожими на субстрат).

Конкурентный ингибитор связывается с активным центром фермента и уменьшает скорость катализа путем снижения доли молекул фермента, связывающих субстрат. Конкурентное ингибирование зависит от соотношения ингибитор:субстрат и не зависит от абсолютной концентрации ингибитора.

Неконкурентный ингибитор имеет свой участок связывания на молекуле фермента, отличный от активного центра. Следовательно, неконкурентное ингибирование зависит от абсолютной концентрации ингибитора и не зависит от соотношения ингибитор:субстрат.

Действие обратимых ингибиторов снижается при разведении сыворотки, и активность фермента якобы повышается, что часто наблюдают в клинко-диагностических лабораториях (КДЛ). Ингибирующим действием могут обладать некоторые лекарственные препараты.

Все ферменты проявляют свою каталитическую активность в водной среде. Действие каждого фермента строго ограничено одним типом реакции и одним субстратом или очень небольшим числом близкородственных субстратов, это определяет *специфичность фермента*. Например, фосфатаза катализирует реакцию отщепления фосфата от β -глицерофосфата, р-NPP, АМФ и некоторых других субстратов.

Взаимодействие фермента $[E]$ и субстрата $[S]$ осуществляется путем образования активного комплекса фермент-субстрат $[ES]$ и его последующего распада с образованием продукта реакции $[P]$ и фермента $[E]$ (рис. 1).

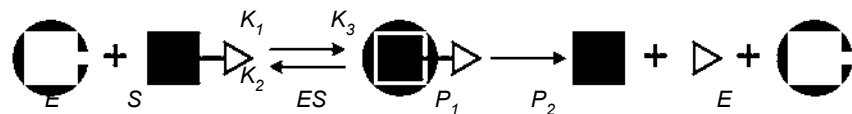


Рис. 1. Схема ферментативной реакции.

Субстрат в комплексе $[ES]$ связан с определенным участком молекулы фермента – «активным центром». Активный центр – это трехмерное образование, чаще всего он имеет вид узкого углубления или щели. Именно в активном центре субстрат превращается в продукт. Условно в активном центре фермента можно выделить два участка – связывающий и каталитический. «Архитектура» (расположение атомов) связывающего участка активного центра фермента определяет его комплиментарность структуре субстрата, т. е. обеспечивает специфичность фермента. Это хорошо известная теория «ключа и замка». Субстрат комплиментарен связывающему участку активного центра, как ключ замку. Вместе с тем активные центры некоторых ферментов не являются жесткой структурой. У этих ферментов форма активного центра становится комплиментарной форме субстрата только после его связывания. Фермент своим активным центром как бы «обволакивает» субстрат.

Фермент, катализируя химическую реакцию, обеспечивает ее протекание с определенной скоростью (V). V – это скорость, с которой уменьшается концентрация субстрата или увеличивается концентрация продукта в процессе реакции. Другими словами, это изменение концентрации субстрата или продукта в единицу времени. Скорость реакции обычно измеряют в мкмоль/мин.

Для каждой ферментативной реакции можно построить кинетическую кривую, которая отражает изменение концентрации продукта (она возрастает) или субстрата (она снижается) в процессе реакции (рис. 2). Концентрация фермента при этом посто-

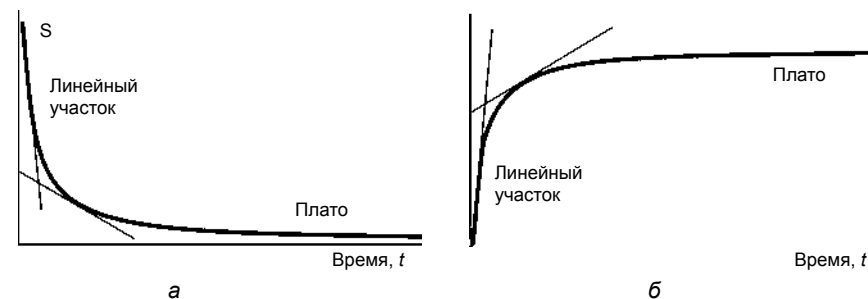


Рис. 2. Кинетическая кривая ферментативной реакции, подчиняющаяся уравнению Михаэлиса-Ментена:

а – субстрат (нисходящая кинетика); б – продукт (восходящая кинетика).

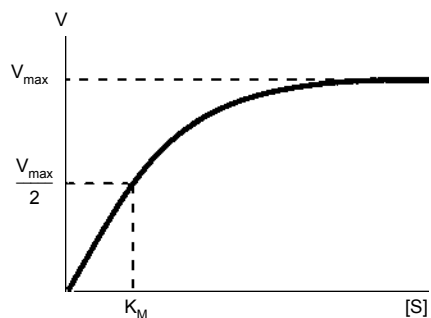


Рис. 3. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата.

ным можно отнести: концентрации субстрата и фермента, присутствие активатора или ингибитора и их концентрации, pH и температуру среды, природу буферного раствора и его концентрацию. Рассмотрим их подробнее.

Одним из наиболее важных факторов, определяющих скорость ферментативной реакции, является концентрация субстрата $[S]$. Характерная кривая, отражающая эту зависимость при постоянной концентрации фермента, представлена на рис. 3. Такая зависимость справедлива для очень многих ферментов и описывается уравнением Михаэлиса-Ментена:

$$V = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

Из кривой видно, что при низких концентрациях субстрата ($\leq 10\%$ от насыщающей), скорость реакции V прямо пропорциональна концентрации субстрата.

При высоких концентрациях субстрата, когда все активные центры фермента связаны с субстратом (насыщающая концентрация), скорость реакции достигает своего максимума V_{max} и не зависит от концентрации субстрата. Константа Михаэлиса (K_M), входящая в состав уравнения, численно равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной. При дальнейшем увеличении концентрации субстрата скорость реакции не изменяется, а иногда может начать уменьшаться, т. е. наблюдается так называемое ингибирование фермента субстратом.

янна. Скорость реакции в любой момент времени определяют как тангенс угла наклона касательной к кинетической кривой. Из кривых видно, что скорость реакции на различных участках кинетической кривой, т. е. в различные промежутки времени, отличается.

На скорость ферментативной реакции влияют многие факторы. К глав-

Именно при насыщающей концентрации субстрата определяют *активность фермента*, которая численно равна скорости ферментативной реакции в оптимальных условиях на начальном линейном участке кинетической кривой (рис. 2). Концентрация субстрата при этом должна в 5–10 раз превышать K_M для данной реакции. Очевидно, что все факторы, влияющие на скорость ферментативной реакции, влияют и на активность фермента.

Каталитическую активность ферментов выражают в единицах активности. Чаще всего в лабораторной практике используют международные единицы активности.

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

Единица активности в системе СИ – катал (кат.). Она соответствует количеству фермента, которое катализирует превращение 1 моля субстрата или получение 1 моля продукта в секунду.

$$1 \text{ кат.} = 6 \cdot 10^7 \text{ МЕ.}$$

$$1 \text{ МЕ} = 16,67 \cdot 10^{-9} \text{ кат.}$$

В медицине концентрацию ферментов в биологических жидкостях принято выражать в единицах активности на литр (МЕ/л, кат./л).

Иногда используют другие (немеждународные) единицы активности. Это целесообразно, например, в тех случаях, когда субстрат или продукт, по которому определяют активность, представляет собой смесь полимерных молекул различной длины и его концентрацию нельзя выразить в мкмоль/л. В этом случае ее выражают, например, в г/л или мг/л. Так, при определении активности α -амилазы методом Каравея в качестве субстрата используют крахмал, который представляет собой смесь полисахаридов различной длины, соответственно, активность измеряют в г/(л · ч) или в мг/(л · с).

Одни ферменты имеют один активный центр, а другие, в основном субъединичные, имеют несколько активных центров, которые влияют друг на друга (кооперативный эффект). Такие ферменты называют *аллостерическими*. Связывание и превращение последующих молекул субстрата у них прогрессивно ускоряется. В этом случае график зависимости скорости от концентрации субстрата будет иметь сигмоидальную форму. Аналогичный вид будет иметь и кинетическая кривая (рис. 4). Аллостерическими могут быть как активаторы, так и ингибиторы.

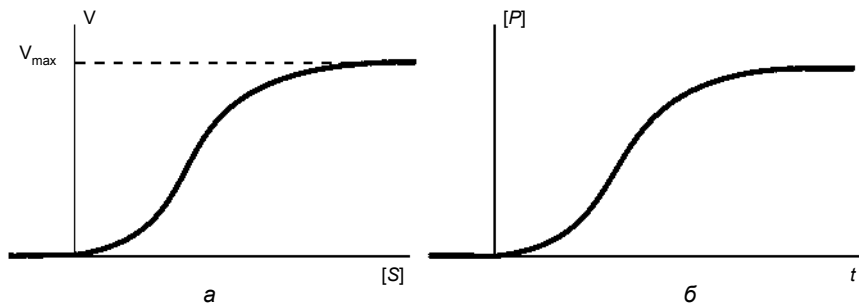


Рис. 4. Зависимость для аллостерических ферментов скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (а) и кинетическая кривая (б).

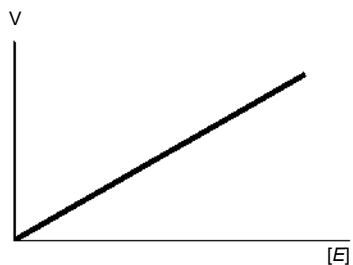


Рис. 5. Зависимость скорости реакции от концентрации фермента.

В большинстве случаев скорость ферментативной реакции V прямо пропорциональна концентрации фермента $[E]$ (рис. 5), т. е., определив по скорости реакции активность фермента, можно оценить концентрацию фермента в биологической жидкости.

Кроме того, скорость ферментативной реакции, а значит, и активность фермента зависит от природы субстрата и с различными субстратами для одного и того же фермента может отличаться в несколько раз. Например, скорость гидролиза μ -АМФ фосфодиэстеразой из сердца быка в 15 раз превышает скорость гидролиза УМФ. β -галактозидаза из *E. coli* гидролизует 2-нитрофенил- β -галактозид в 7 раз быстрее, чем 4-нитрофенил- β -D-галактозид.

Скорость ферментативной реакции зависит от pH реакционной смеси. Так как в активный центр многих ферментов входят ионные группы, изменение состояния ионизации этих групп при сдвиге pH может оказать сильное влияние на скорость ферментативной реакции; значение pH, при котором достигается максимальная скорость катализируемой реакции, называют *pH-оптимумом фермента*. У разных ферментов он может существенно отличаться. Так, pH-оптимум пепсина – 1,5, а щелочной фосфатазы – 9–10, хотя для большинства внутриклеточных ферментов он лежит в интервале 6–8 ед. pH. На рис. 6 представлена зависимость скорости гидролиза ацетилхолина ацетил-

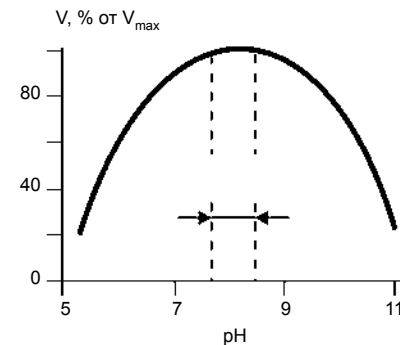


Рис. 6. Зависимость скорости гидролиза ацетилхолина ацетилхолинэстеразой от pH инкубационной среды.

холинэстеразой от pH реакционной смеси. Очевидно, что среда, в которой проводят ферментативную реакцию и тем более определение активности фермента, должна иметь pH, близкий к pH-оптимуму данного фермента.

Следующий параметр, который значительно влияет на скорость ферментативной реакции – температура. Повышение температуры всего на 1°C увеличивает скорость ферментативной реакции на 2,5–20,0%. Эта закономерность справедлива до температуры $50\text{--}60^\circ\text{C}$. При более высоких температурах наступает денатурация ферментов (рис. 7). Поэтому активность ферментов определяют при фиксированной температуре $25, 30, 37^\circ\text{C}$, допустимы колебания лишь в $\pm 0,1^\circ\text{C}$. Например, при 37°C , активность γ -ГТ в 1,7 раза, а активность альдолазы в 2,4 раза выше, чем при 25°C .

На скорость ферментативной реакции влияет также ионная сила, т. е. концентрация буферного раствора и солей. Обычно концентрации буферных растворов варьируют от 0,01 до 0,10 моль/л. На рис. 8 приведена зависимость активности щелочной фосфатазы

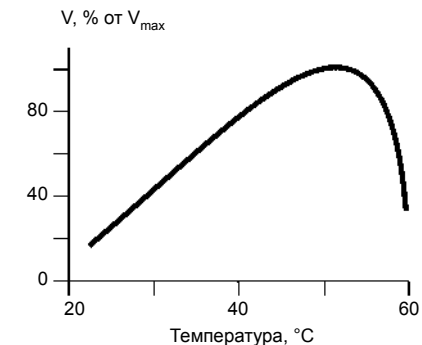


Рис. 7. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры.



Рис. 8. Зависимость скорости гидролиза p-NPP щелочной фосфатазой от концентрации диэтаноломинового буфера.

Таблица 2

| Классы ферментов | | |
|------------------|-----------------|---|
| Номер класса | Название класса | Катализируемые реакции |
| 1 | оксидоредуктазы | окислительно-восстановительные |
| 2 | трансферазы | перенос групп |
| 3 | гидролазы | гидролиз |
| 4 | лиазы | расщепление негидролитическим путем связей С-С, отщепление групп с образованием двойной связи, присоединение по двойной связи |
| 5 | изомеразы | изомерные превращения |
| 6 | лигазы | присоединение друг к другу двух молекул с использованием энергии АТФ (или других высокоэнергетических соединений) |

от концентрации диэтаноламинового буфера. Природа буфера также часто важна. Так, в буфере *HEPES* α -амилаза проявляет вдвое большую активность, чем в буфере *PIPES*.

Из вышесказанного можно заключить, что ферменты являются не только высокоэффективными и высокоспецифичными биологическими катализаторами, но и высокочувствительными, тонкими биохимическими структурами. Скорость катализируемой ферментом реакции, а значит, и его активность существенно зависит от условий инкубационной среды. Поэтому для получения правильных и воспроизводимых результатов от персонала лабораторий требуется, наряду с четким, грамотным выполнением прилагаемой инструкции, понимание сути происходящих во время анализа процессов.

Комиссия по ферментам при Международном биохимическом союзе разработала классификацию и номенклатуру ферментов. В результате каждый фермент получил свой идентификационный номер (шифр) и систематическое название. В основе принятой классификации ферментов лежит специфичность их действия. По типу катализируемой реакции все ферменты объединены в 6 основных классов (табл. 2). Далее каждый класс разделяется на подклассы, которые в свою очередь делятся на подподклассы по тому же принципу, т. е. по типу реакции.

Тривиальные названия ферментов часто образуют прибавлением суффикса *-аз(а)* к названию субстрата. Например, фермент

уреаза катализирует гидролиз мочевины (*urea-уреа*) до аммиака и двуокиси углерода. В то же время его систематическое название (по номенклатуре) – мочевиная амидогидролаза, шифр 3.5.1.5, который указывает, что уреаза относится к классу 3, подклассу 5, подподклассу 1 и номер фермента в подподклассе – 5.

2. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Определение активности ферментов в сыворотке крови и моче является незаменимым орудием в диагностике и мониторинге целого ряда заболеваний. Это не удивительно, так как ферменты участвуют во всех биохимических процессах организма и нарушение метаболизма, вызванное заболеванием, безусловно, приводит к изменению концентрации соответствующих ферментов в биологических жидкостях.

Определять абсолютное содержание ферментов в биологических жидкостях с диагностическими целями нецелесообразно, так как существующие методы трудоемки, требуют много времени и не имеют приемлемых аналитических характеристик. Поэтому в КДЛ с диагностическими целями определяют активность ферментов, которая отражает абсолютное содержание фермента в биологической жидкости. Технически эти методы просты и высокочувствительны. Рассмотрим основные абсорбционные методы определения активности ферментов, на которых базируются коммерческие наборы реагентов.

Как отмечалось выше, активность фермента численно равна скорости ферментативной реакции в оптимальных условиях на начальном линейном участке кинетической кривой при насыщающей концентрации субстрата. Измеряется она в международных единицах (МЕ) активности. Одна МЕ равна количеству фермента, катализирующему превращение 1 мкмоль субстрата или получение 1 мкмоль продукта в минуту. Скорость ферментативной реакции можно определять по изменению концентрации субстрата или продукта в реакционной смеси.

В настоящее время в КДЛ преимущественно определяют активность следующих ферментов (табл. 3). Используемые при этом в коммерческих наборах методы и подходы весьма разнообразны.

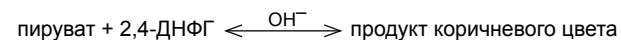
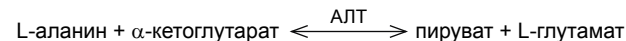
Таблица 3

Основные ферменты биологических жидкостей

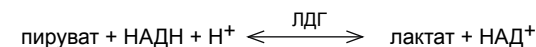
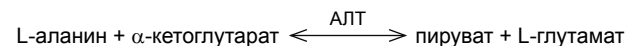
| Фермент, шифр | Кол-во изо-форм | Кол-во субъ-единиц | Молярная масса, кДа | Биологическая жидкость, используемая для анализа | Диагностируемое заболевание |
|---|-----------------|--------------------|---------------------|--|---|
| Аланинаминотрансфераза (АЛТ), 2.6.1.2. | 2 | | 115 | сыворотка, плазма крови | гепатиты и другие заболевания печени |
| Аспаратаминотрансфераза (АСТ), 2.6.1.1 | 2 | | 94 | сыворотка, плазма крови | инфаркт миокарда и паренхиматозные заболевания печени |
| Кислая фосфатаза (КФ), 3.1.3.2 | много | | | сыворотка крови | простатическая карцинома с метастазами |
| Щелочная фосфатаза (ЩФ), 3.1.3.1 | много | 2 | 100 | сыворотка крови | патология костной ткани, гепатобиллиарного тракта, гиперпаратиреоз |
| α -амилаза, 3.2.1.1. | 2 | 1 | 50 | сыворотка крови, моча | паратит, панкреатит |
| γ -глутамил-трансфераза (γ -ГТ), 2.3.2.2 | | 1 | 90 | сыворотка, плазма крови | обструктивные заболевания печени, алкоголизм |
| Креатинкиназа (КК), 2.7.3.2. | 3 | 2 | 81 | сыворотка, плазма крови | инфаркт миокарда, заболевания мышц |
| Лактатдегидрогеназа (ЛДГ), 1.1.1.27 | 5 | 4 | 135 | сыворотка крови | мегалобластная и перцинозная анемия, паренхиматозные заболевания печени |
| Глутаматдегидрогеназа (ГлДГ), 1.4.1.3 | 6 | 4 | 1000 | сыворотка, плазма крови | паренхиматозные заболевания печени |
| Альдолаза (АЛД), 4.1.2.13 | 5 | 4 | 158 | сыворотка, плазма крови | заболевания мышц |
| Липаза (ЛИП), 4.1.1.3 | 3 | 1 | 48 | сыворотка, плазма крови | патология поджелудочной железы |
| Холинэстераза (ХЭ), 3.1.1.7 | | | | сыворотка, плазма крови | хронические заболевания печени, отравление фосфорорганическими соединениями |
| Лейцинаминопептидаза (ЛАП), 3.4.1.1 | много | | 80 | сыворотка, плазма крови | патология гепатобиллиарного тракта |

Основные абсорбционные (спектрофотометрические) методы определения активности ферментов

Аланинаминотрансфераза (АЛТ)

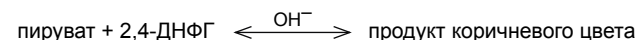
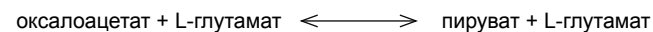
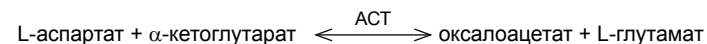
Колориметрический метод Райтмана-Френкеля

Активность АЛТ пропорциональна количеству образовавшегося пирувата, который при добавлении в реакционную смесь 2,4-динитрофенилгидрозина образует динитрофенилгидрозон-пируват, имеющий в щелочной среде коричневую окраску. Интенсивность окраски пропорциональна активности АЛТ.

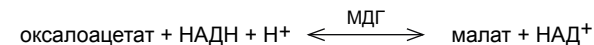
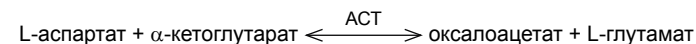
Кинетический УФ метод

Скорость окисления НАДН пропорциональна активности АЛТ.

Аспаратаминотрансфераза (АСТ)

Колориметрический метод Райтмана-Френкеля

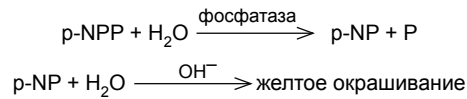
Активность АСТ пропорциональна количеству образовавшегося пирувата, который при добавлении в реакционную смесь 2,4-динитрофенилгидрозина образует динитрофенилгидрозон-пируват, имеющий в щелочной среде коричневую окраску. Интенсивность окраски пропорциональна активности АСТ.

Кинетический УФ метод

Скорость окисления НАДН пропорциональна активности АСТ.

Кислая фосфатаза (КФ)

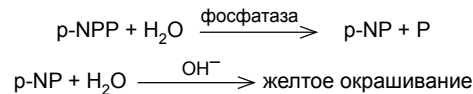
Колориметрический метод, субстрат p-NPP



Количество образовавшегося p-NP пропорционально активности фермента. Активность простатического изофермента блокируется тартратом.

Щелочная фосфатаза (ЩФ)

Колориметрический метод, субстрат p-NPP



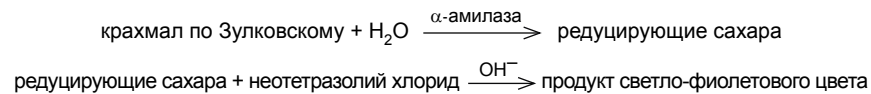
Количество образовавшегося p-NP пропорционально активности фермента. Скорость образования p-NP пропорциональна активности фермента.

Альфа-амилаза

Колориметрический метод Карая

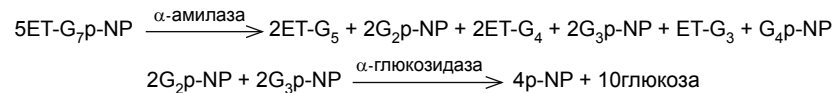
Под действием α -амилазы крахмал гидролизуеться с образованием продуктов, не дающих цветной окраски с йодом. Скорость уменьшения окраски йод-крахмального комплекса пропорциональна активности фермента.

Колориметрический сахарогенный метод



Интенсивность окраски продукта реакции пропорциональна активности фермента.

Колориметрический кинетический метод, субстрат EPS



Скорость образования p-NP пропорциональна активности фермента.

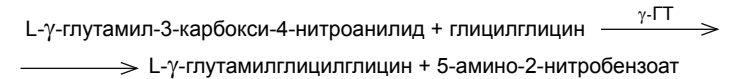
Колориметрический кинетический метод, субстрат CNP-G3



Скорость образования CNP прямо пропорциональна активности фермента.

Гамма-глутамилтрансфераза (γ -ГТ)

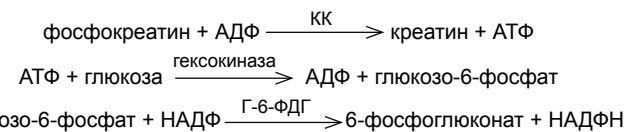
Колориметрический метод



Скорость образования 5-амино-2-нитробензоата пропорциональна активности фермента. Количество образовавшегося 5-амино-2-нитробензоата пропорционально активности фермента.

Креатинкиназа (КК)

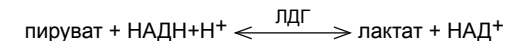
Кинетический УФ метод



Скорость образования НАДФН пропорциональна количеству фермента в пробе.

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)

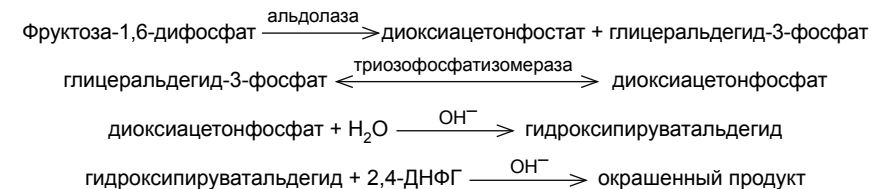
Кинетический УФ метод



Скорость окисления НАДН пропорциональна активности ЛДГ.

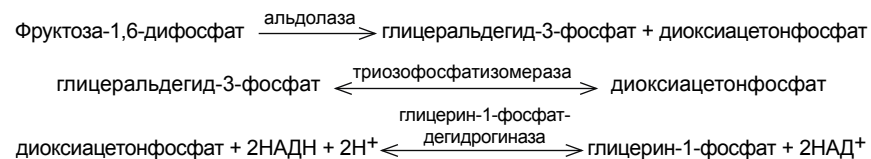
Альдолаза (АЛД)

Энзиматический колориметрический метод



Интенсивность окраски продукта реакции пропорциональна активности фермента.

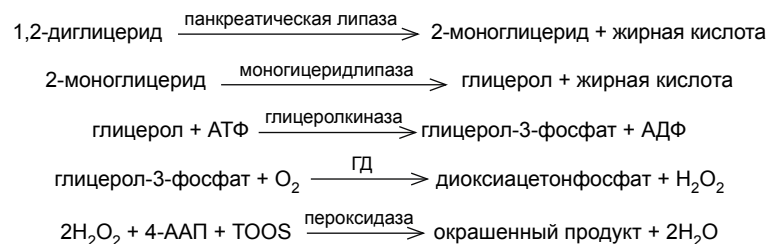
Кинетический УФ метод



Скорость окисления НАДН пропорциональна концентрации альдолазы.

Липаза (ЛИП)

Энзиматический колориметрический метод

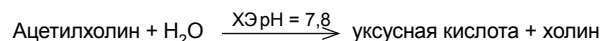


Скорость увеличения абсорбции реакционной смеси при 550 нм пропорциональна концентрации липазы.

TOOS = N-этил-N-(2-гидрокси-3-сульфопропил)-m-толуидин

Холинэстераза (ХЭ)

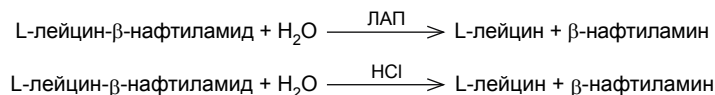
Колориметрический метод, субстрат ацетилхолин



Уксусная кислота уменьшает интенсивность окраски m-нитрофенола. Уменьшение окраски пропорционально концентрации фермента.

Лейцинаминопептидаза (ЛАП)

Колориметрический метод



Интенсивность окраски реакционной смеси пропорциональна концентрации фермента.

Некоторые из этих методов основаны на измерении скорости изменения концентрации субстрата в реакционной смеси. Концентрация субстрата в реакционной смеси, как известно, уменьшается (нисходящая кинетика) (см. рис. 2, а). Это, например, метод Каравея для определения активности α -амилазы по гидролизу крахмала. Другие (их большинство) основаны на измерении скорости изменения концентрации продукта реакции (восходящая кинетика) (см. рис. 2, б).

Способы определения концентрации продукта реакции или субстрата

1. *Прямое фотометрирование.* Этот способ используют, если субстрат или один из продуктов реакции можно определить фотометрически. Таким продуктом является, например, p-NP, поэтому этот подход используют при определении активности фосфатаз. Кислая и щелочная фосфатазы гидролизуют p-NPP с образованием p-NP, который в щелочной среде окрашивается в желтый цвет, его определяют фотометрически при длине волны 405 нм; p-NP образуется также при гидролизе α -амилазой блокированных мальтоз длиной 5–7 звеньев с присоединенным p-NP (например EPS – 4,6-этилиден(G₇)-p-нитрофенил(G₁)- α ,D-мальтогептаозид). При определении активности γ -ГТ с L- γ -глутамил-3-карбокси-4-нитроанилидом также образуется продукт, количество которого можно определить фотометрически при длине волны 405 нм.

2. *Окрашивание субстрата или продукта красителем.* Если напрямую фотометрировать продукт или субстрат не удастся, то их дополнительно окрашивают. Так, в методе Каравея субстрат-крахмал окрашивают йодом. В методе Райтмана-Френкеля при определении трансаминаз продукт пируват окрашивают 2,4-ДНФГ.

3. *Тест Варбурга.* В некоторых методах используют сопряженную ферментативную реакцию с участием кофермента НАДН или НАДФН, которые имеют максимум поглощения в УФ области при 340 нм, в то же время их окисленная форма, образующаяся в результате реакции (НАД⁺ или НАДФ⁺), при этой длине волны не поглощает (рис. 9). На этом принципе основаны методы для определения активности АЛТ, АСТ, ЛДГ, альдолазы, креатинкиназы.

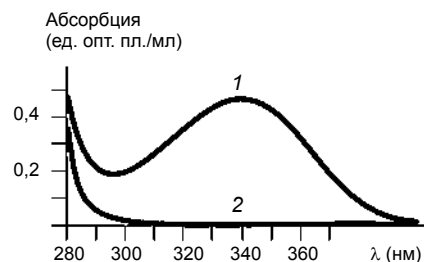


Рис. 9. Спектр поглощения НАДН (1) и НАД⁺ (2)

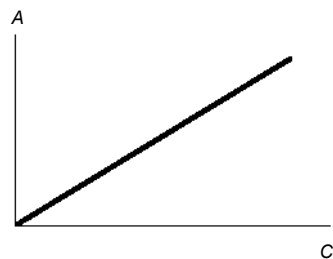


Рис. 10. График соотношения между концентрацией вещества (С) и абсорбцией (А).

В условиях реакции при определении активности фермента, как правило, оптическая плотность реакционной смеси прямо пропорциональна концентрации продукта (субстрата) или кофермента соответственно, т. е. подчиняется закону Бугера-Ламберта-Бера (рис. 10). Таким образом, чтобы измерить скорость ферментативной реакции, надо измерить изменение оптической плотности A в единицу времени (в минуту).

Способы измерения скорости ферментативной реакции

В наборах для определения активности ферментов используют несколько способов определения скорости ферментативной реакции.

1. *Измерение «по конечной точке» (end point method)* (рис. 11, а). Он заключается в измерении оптической плотности на линейном участке кинетической кривой по истечении определенного четко фиксированного отрезка времени t от начала реакции (внесения исследуемой пробы в реакционную смесь). Такой способ называют еще одноточечной кинетикой. Как правило, по истечении указанного отрезка времени t в реакционную смесь добавляют реагент, останавливающий ферментативную реакцию, например щелочь или кислоту. Отсюда и название метода – «по конечной точке», т. е. с остановкой реакции. Этот способ применяют в большинстве рутинных методов (в методе Райтмана-Френкеля, сахарогенном методе определения α -амилазы, при определении активности фосфатаз и т. д.). Скорость изменения оптической плотности рассчитывают по формуле: $\Delta A/\text{мин} = (A - A_{\text{хол}})/t$, где $A_{\text{хол}}$ – оптическая плотность холостой пробы на реагент или сыворотку, если послед-

няя вносит значительный вклад в окраску реакционной смеси. На самом деле это вариант двухточечной кинетики, о которой речь пойдет ниже. Только первое измерение оптической плотности на линейном участке кинетической кривой проводят в момент начала реакции, когда время реакции равно нулю и продукт реакции еще не образовался. Оптическая плотность реакционной смеси в этот момент равна оптической плотности холостой пробы.

2. *Измерение двухточечное (two point method)* (рис. 11, б). При этом способе оптическую плотность определяют на линейном участке кинетической кривой дважды, четко фиксируя интервал времени t между измерениями. Скорость изменения оптической плотности рассчитывают по формуле: $\Delta A/\text{мин} = (A_2 - A_1)/t$. Этот способ используют, например, в современных методах определения активности α -амилазы на основе блокированных мальтоз и щелочной фосфатазы.

3. *Измерение многоточечное, или кинетическое (kinetic measurement)* (рис. 11, в). При этом способе оптическую плотность на линейном участке кинетической кривой определяют 3–5 и более раз через четко фиксированные равные интервалы времени t . Скорость изменения оптической плотности рассчитывают по формуле: $\Delta A/\text{мин} = \Delta \bar{A}/t$. Либо для повышения точности измерения применяют иной способ, а именно: по данным оптической плотности, взятым через равные интервалы времени t , программа биохимического анализатора вычисляет линейную зависимость вида $A = b_1 t + b_0$, наилучшим образом приближенную к фактическим данным. Вычисление ведется методом наименьших квадратов. Коэффициент b_1 ,

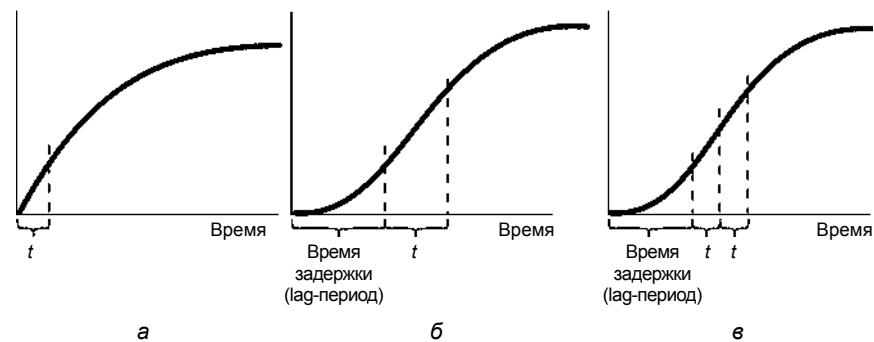


Рис. 11. Измерение скорости ферментативной реакции: а – «по конечной точке»; б – двухточечное; в – многоточечное.

выраженный в единицах абсорбции в минуту, и представляет собой скорость изменения оптической плотности, т. е. $\Delta A/\text{мин}$.

Многоточечная кинетика используется только для биохимических анализаторов, так как в ручном варианте это достаточно трудоемко. На этом способе основано, например, определение активности АЛТ и АСТ ультрафиолетовыми методами. Двух- и многоточечный варианты особенно эффективны при определении активности аллостерических ферментов, т. е. в случаях, когда имеется lag-период. Многоточечная кинетика считается наиболее точным способом измерения скорости.

Расчет ферментативной активности

Ферментативную активность рассчитывают по калибратору, калибровочной кривой и коэффициенту экстинкции продукта или кофермента.

1. *Расчет по калибратору* (стандарту) проводят, если можно приготовить стабильный дешевый калибратор и включить его в состав набора. Как правило, им является раствор продукта реакции известной концентрации. При этом на всей области определения активности фермента оптическая плотность реакционной смеси должна линейно зависеть от концентрации продукта (субстрата), т. е. подчиняться закону Бугера-Ламберта-Бера (см. рис. 10). Расчет по калибратору используют, например, при определении активности α -амилазы сахарогенным методом.

2. *Расчет по калибровочной кривой* проводят, если оптическая плотность реакционной смеси нелинейно зависит от концентрации продукта реакции (рис. 12, а).

Это может происходить по ряду причин: поток световой энергии не является монохроматическим, что имеет место, когда используют интерференционные и стеклянные светофильтры, т. е. зависит от средств измерения оптической плотности; молекулы растворителя взаимодействуют с частицами вещества, поглощающими световую энергию, это взаимодействие изменяется с изменением концентрации вещества; изменение рН раствора влияет на устойчивость образующихся соединений; прочее.

При нелинейной зависимости оптической плотности реакционной смеси от концентрации продукта реакции в процессе анализа одновременно с опытными пробами инкубируют не менее четырех стандартных проб, содержащих продукт в различных, но известных

концентрациях. По полученным данным строят калибровочный график в координатах $\{X = E\}$, $\{Y = \Delta A/\text{мин}\}$ (или $Y = \Delta A/\text{за время реакции}$, $\Delta A = A_{\text{оп}} - A_{\text{хол}}$) и по нему находят активность фермента в опытной пробе. Этот способ используют, например, в методе для определения активности α -амилазы на основе нерастворимого крахмала (см. рис. 12, б), в методе Райтмана-Френкеля при определении трансаминаз или γ -ГТ методом «по конечной точке».

3. *Расчет по коэффициенту экстинкции продукта* или кофермента проводят, если эти вещества обладают оптической плотностью и их прямое фотометрирование можно осуществить в процессе анализа, а оптическая плотность реакционной смеси линейно зависит от концентрации продукта или кофермента. Для расчета используют формулу Бугера-Ламберта-Бера:

$$E = \Delta A/\text{мин} \times \frac{V \times 1000}{\underbrace{\varepsilon \times l \times v}_F}$$

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).

Для удобства вычислений можно самим заранее рассчитать дробь в этой формуле, ее обозначают F и называют фактором. Зна-

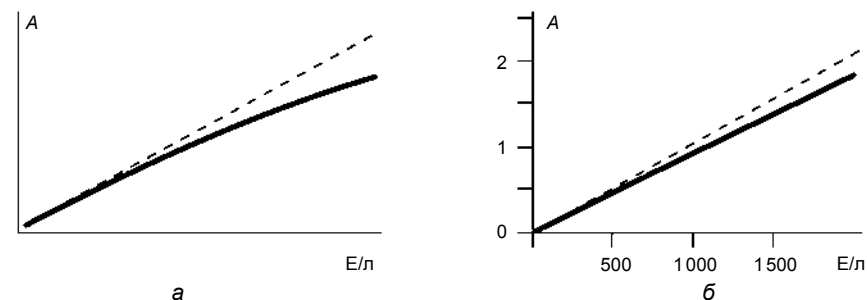


Рис. 12 Калибровочная кривая: а – при отклонении от закона Бугера-Ламберта-Бера; б – при определении активности α -амилазы с нерастворимым крахмалом (время инкубации 15 мин).

Методы определения активности ферментов

| Группа методов | Фермент (название метода) | Способ измерения скорости реакции | Расчет активности по |
|---------------------------------------|---|--|---|
| Колориметрические по «конечной точке» | α-амилаза (по Каравею) α-амилаза (сахарогенный) АЛТ (Райтмана-Френкеля) АСТ (Райтмана-Френкеля) АЛД (энзиматический) g-ГТ ЛАП КФ (DGKS) холинэстераза ЩФ (DGKS) | одноточечная кинетика с остановкой реакции | калибратору, калибровочной кривой, коэффициенту экстинкции продукта |
| Колориметрические кинетические | α-амилаза (IFCC, субстрат EPS и др.) g-ГТ ЩФ (DGKS) ЛИП (энзиматический) | двух- или многоточечная кинетика | калибратору или коэффициенту экстинкции продукта |
| УФ кинетические | АЛТ (IFCC) АСТ (IFCC) ЛДГ (SFBC) КК (IFCC, DGKS) АЛД | многоточечная кинетика | коэффициенту экстинкцико-фермента |

чение фактора можно ввести в программу биохимического анализатора. Этот способ используют, например, в наборах для определения АЛТ, АСТ, ЛДГ УФ-методами, щелочной и кислой фосфатаз с p-NPP, α-амилазы с блокированными мальтозами, γ-ГТ кинетическим методом с L-γ-глутамил-3-карбокси-4-нитроанилидом и т. д.

При использовании наборов, расчет активности фермента в которых проводят по коэффициенту миллимолярной экстинкции, необходимо убедиться, что прибор, используемый для фотометрирования, обеспечивает установку указанной в инструкции длины волны. Если длина волны не соответствует указанной в инструкции, полученные результаты будут неверны (рис. 9, 13). В крайнем случае, если не удастся исправить или заменить прибор, можно скорректировать фактор по мультикалибратору производства передовой зарубежной фирмы, если он аттестован тем же методом, т. е. пересчитать экстинкцию, а значит, и фактор для реальной длины волны, которую обеспечивает прибор. Для пересчета можно использовать формулу:

$$F = \frac{E_{mk}}{\Delta A/\text{мин}}$$

где F – новый фактор, скорректированный для вашего прибора, E_{mk} – активность фермента в мультикалибраторе по паспорту, $\Delta A/\text{мин}$ – скорость изменения оптической плотности реакционной смеси, полученная вами при определении активности фермента в мультикалибраторе.

Определение активности фермента в мультикалибраторе надо повторить не менее 5 раз и рассчитать F как среднее арифметическое этих определений.

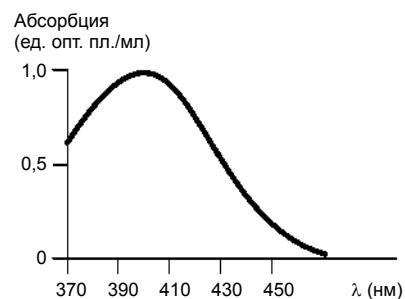


Рис. 13. Спектр p-NP.

Таким образом, все наиболее часто используемые в КДЛ коммерческие наборы реагентов для определения активности ферментов можно разделить на три группы: колориметрические «по конечной точке», колориметрические кинетические и УФ кинетические (табл. 4).

Так как на активность ферментов существенно влияют условия реакции (природа и кон-

центрация субстрата, природа и концентрация буфера, рН, активаторы и т. д.), чтобы различать используемые методы и стандартизовать измерения активности ферментов в разных лабораториях и странах, предложено следовать нескольким рекомендациям: Международного общества клинической химии (IFCC), Европейского общества клинической химии (ECCLS), Скандинавского общества клинической химии (SCE), Французского общества клинической биологии (SFBC), Немецкого общества клинической химии (DGKS) и некоторым другим. Как правило, в коммерческих наборах указано, рекомендациям какого общества соответствует набор. Все наборы реагентов, отвечающие определенным рекомендациям, основаны на одном методе, имеют одинаковый состав и рН реакционной смеси, а также одинаковые прочие условия проведения анализа, что обеспечивает получение сравнимых результатов.

Для контроля правильности и воспроизводимости определения активности ферментов коммерческими наборами следует пользоваться коммерческими контрольными сыворотками и кон-

трольными материалами, содержащими соответствующие ферменты и аттестованными соответствующими методами. В паспорте к контрольной сыворотке должно быть указано, не только каким методом она аттестована, но и рекомендациям какого общества он соответствует.

3. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБСТРАТОВ

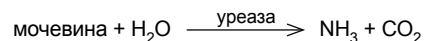
Общеизвестно, что в последнее десятилетие в клинической биохимии ферментативные методы анализа постепенно вытесняют химические. Ферментативные методы выгодно отличаются от химических высокой специфичностью (практически не дают интерференции), низкой температурой реакций (не выше 37°C), водной инкубационной средой (отсутствием токсических веществ). Во всех этих методах аналит участвует в ферментативной реакции в качестве субстрата (вот почему говорят о ферментативных методах определения субстратов).

В настоящее время в КДЛ коммерческими наборами реагентов, в основе которых лежат ферментативные методы, определяют следующие аналиты: глюкозу, креатинин, мочевину, мочевую кислоту, молочную кислоту, триглицериды, холестерин, ЛВП-холестерин, фосфолипиды, этанол. Рассмотрим подробнее схемы реакций и принципы этих методов.

Основные абсорбционные (спектрофотометрические) методы определения субстратов

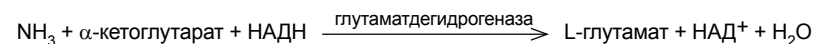
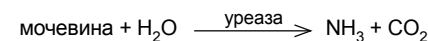
Мочевина

Уреазный/салицилатгипохлоритный, уреазный/фенолгипохлоритный метод



Интенсивность окраски продукта реакции пропорциональна концентрации мочевины. В фенолгипохлоритном методе вместо салицилата натрия используют фенол и получают продукт голубого цвета.

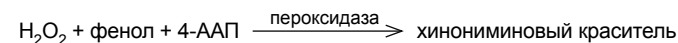
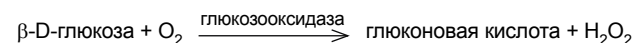
Уреазный/глутаматдегидрогеназный метод



Скорость окисления НАДН пропорциональна концентрации мочевины.

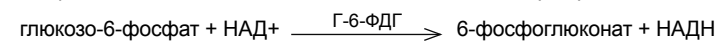
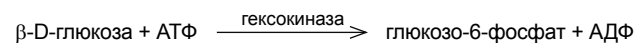
Глюкоза

Глюкозооксидазный/пероксидазный метод



Концентрация продукта реакций пропорциональна концентрации глюкозы в пробе. Скорость образования продукта реакций пропорциональна концентрации глюкозы.

Гексокиназный метод



Количество образовавшихся в результате сопряженных реакций НАДН пропорционально концентрации глюкозы в пробе.

Мочевая кислота

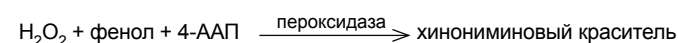
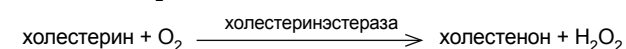
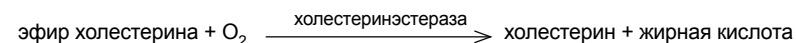
Уриказный/пероксидазный метод



Концентрация продукта реакций пропорциональна концентрации мочевой кислоты в пробе.

Холестерин

Холестеринооксидазный/пероксидазный метод



Концентрация продукта реакций пропорциональна концентрации холестерина в пробе.

ЛВП-холестерин

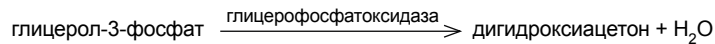
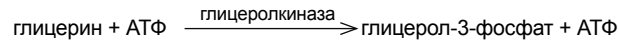
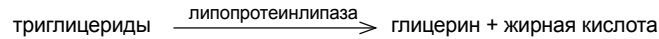
Холестериноксидазный/пероксидазный метод

После осаждения ЛНП и ЛОНП в супернатанте определяют ЛВП по методу определения холестерина.

Концентрация продукта реакций пропорциональна концентрации ЛВП-холестерина в пробе.

Триглицериды

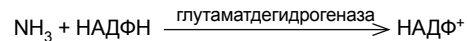
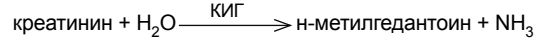
Глицеролфосфатоксидазный/пероксидазный метод



Концентрация продукта реакций пропорциональна концентрации три-глицеридов в пробе.

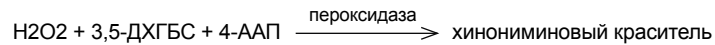
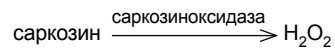
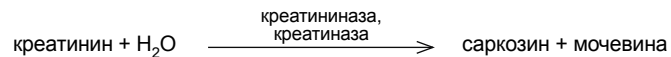
Креатинин

Креатининиминогидролазный/глутаматдегидрогеназный метод



Скорость окисления НАДФН пропорциональна концентрации креатинина.

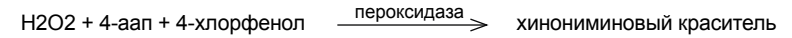
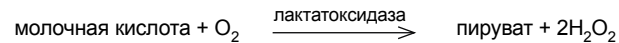
Саркозиноксидазный/пероксидазный метод



Концентрация продукта реакций пропорциональна концентрации креатинина в пробе.

Молочная кислота

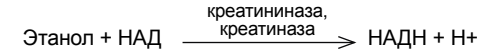
Лактатоксидазный/пероксидазный метод



Концентрация продукта реакций пропорциональна концентрации молочной кислоты в пробе.

Этанол

Алкогольдегидрогеназный метод



Скорость образования НАДН пропорциональна концентрации этанола.

По способу фотометрирования эти методы разделяют на колориметрические методы и УФ методы, когда фотометрирование осуществляют при длине волны 340 нм. По участку кинетической кривой, на котором происходит фотометрирование, различают кинетические методы и методы по конечной точке (рис. 14).

В первом случае фотометрирование осуществляют на начальном линейном участке кинетической кривой (рис. 14, а, б), при этом скорость изменения оптической плотности реакционной смеси прямо пропорциональна концентрации аналита; во втором – когда кинетическая кривая выходит на плато (рис. 14, в), при этом оптическая плотность реакционной смеси прямо пропорциональна концентрации аналита.

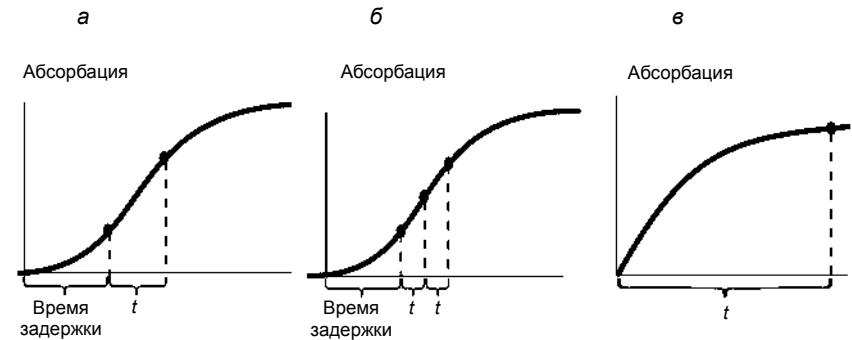


Рис. 14. Ферментативные методы определения субстратов:

а – двухточечная кинетика; б – многоточечная кинетика; в – по конечной точке.

Таким образом, все используемые методы можно объединить в 4 группы (табл. 5): колориметрические по конечной точке, колориметрические кинетические, УФ методы по конечной точке и кинетические УФ методы.

Таблица 5
Ферментативные методы определения аналитов

| Аналит | Колориметрические по конечной точке | Колориметрические кинетические | УФ по конечной точке | УФ кинетические |
|------------------|---|---------------------------------|---|---|
| Мочевина | уреазный/салицилатгипохлоритный | | | уреазный/глутаматдегидрогеназный (НАДН→НАД ⁺) |
| Глюкоза | уреазный/фенолгипохлоритный | | | |
| Глюкоза | глюкозооксидазный/пероксидазный | глюкозооксидазный/пероксидазный | гексокиназный (НАД ⁺ → НАДН) | |
| Мочевая кислота | уриказный/ пероксидазный | | | |
| Холестерин | холестериноксидазный/ пероксидазный | | | |
| ЛВП-холестерин | холестериноксидазный/ пероксидазный | | | |
| Триглицериды | глицеролфосфатоксидазный/ пероксидазный | | | |
| Креатинин | саркозиноксидазный/ пероксидазный | | | креатининиминогидролазный, (НАДФН→НАДФ ⁺) |
| Молочная кислота | лактатоксидазный/ пероксидазный | | | |
| Этанол | | | | алкогольдегидрогеназный (НАД ⁺ → НАДН) |

Колориметрические методы по конечной точке

Как видно из табл. 5, эта группа наиболее многочисленная. Проанализировав методы, входящие в ее состав, можно заметить, что суть их заключается в следующем:

1. На первом этапе аналит с помощью ферментативной реакции или цепи реакций превращают в продукт, который можно определить колориметрическим методом.

2. На втором этапе этот продукт взаимодействует с хромогенным комплексом, в результате образуется окрашенное соединение, которое фотометрируют (отсюда название «колориметрические методы»). Интенсивность его окраски пропорциональна концентрации аналита в биологической жидкости. Так, уреазы превращают мочевину в аммиак, который при взаимодействии с салицилатом-Na и гипохлоритом-Na в присутствии нитропруссид-Na образует продукт зеленого цвета.

Липопротеинлипаза, глицеролкиназа, глицерофосфатоксидаза последовательно превращают триглицериды в перекись водорода, которая при взаимодействии с хромогенным комплексом в присутствии пероксидазы образует хинониминный краситель малинового цвета.

Расчет концентрации аналита проводят относительно калибратора по формуле:

$$C = \frac{A_{оп} - A_{хол}}{A_{кал} - A_{хол}} \times C_{кал}$$

где C – концентрация аналита, A_{оп} – оптическая плотность опытной пробы, A_{кал} – оптическая плотность калибровочной пробы, A_{хол} – оптическая плотность холостой пробы, C_{кал} – концентрация калибратора.

Как правило, в качестве калибратора используют калибровочный раствор соответствующего аналита или промежуточного продукта каскада реакций (например глицерина при определении триглицеридов). Во всех методах, кроме метода определения мочевины, одним из конечных продуктов ферментативной реакции или реакций является перекись водорода, которая в присутствии фермента пероксидазы окисляет хромогенный комплекс, состоящий из 4-ААП, фенола (или 4-хлорфенола) и 3,5-ДХГБС в различных комбинациях, в хинониминный краситель малинового цвета, количество которого определяют фотометрически.

Следует отметить, что все реакции как первого, так и второго этапов должны за время инкубации обеспечивать полное превращение субстратов в продукты, т. е. кинетика всех реакций должна выходить на плато (доходить до конца), отсюда название «по конечной точке».

Чтобы все реакции проходили до конца, необходимо очень аккуратно и точно соблюдать условия инкубации, указанные в инструкции к используемому набору реагентов (рН, температуру, время реакции и т. д.). При постановке этих методов задача врача-лаборанта – обеспечить инкубацию реакционной смеси при заданной температуре в течение времени не меньшем, чем указано в инструкции. Небольшое увеличение времени инкубации в пределах времени стабильности окраски не скажется отрицательно на результатах анализа.

Анализ мочевины двухстадийный. Сначала проводят гидролиз, затем – окрашивание. Во всех приведенных в табл. 5 пероксидазных методах анализ одностадийный: готовят один рабочий реагент, содержащий все необходимые компоненты для ферментативных реакций и реакции окрашивания.

Колориметрические кинетические методы

К этой группе (см. табл. 5) можно отнести методы, по своей сути аналогичные группе методов, колориметрических по конечной точке, но фотометрирование в этом случае проводят на линейном участке кинетической кривой. Скорость изменения оптической плотности реакционной смеси (скорость ферментативной реакции) прямо пропорциональна концентрации аналита. Для определения скорости реакции проводят два (двухточечная кинетика) или несколько (*i*3) (многоточечная кинетика) измерений оптической плотности через четко фиксированный интервал времени *t* (рис. 14). Рассчитывают изменение оптической плотности по формуле: $DA/\text{мин} = A_2 - A_1/t$ (двухточечная кинетика) или $DA/\text{мин} = \Delta A/t$ (многоточечная кинетика).

В связи с постоянным совершенствованием технологических характеристик и матобеспечения биохимических анализаторов многоточечная кинетика, как более точный метод, вытесняет двухточечную, и изменение оптической плотности рассчитывают, используя метод наименьших квадратов также как и в случае определения активности ферментов.

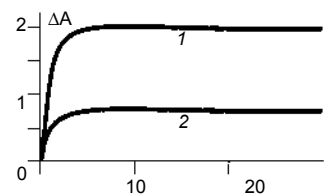


Рис. 15. Кинетика гидролиза мочевины уреазой (1) и окрашивания аммиака хромогенным комплексом (2) в наборе «Мочевина-Ново». Концентрация мочевины 33,3 (1) и 13,3 ммоль/л (2).

К этой группе методов можно отнести кинетический вариант глюкозооксидазного/пероксидазного метода определения глюкозы. Анализ одностадийный: готовят один рабочий реагент, содержащий все необходимое для ферментативных реакций и реакции окрашивания.

УФ методы по конечной точке

К этой группе относится гексокиназный метод определения глюкозы (см. табл. 5). Суть его заключается в том, что на последнем этапе цепи ферментативных реакций превращения глюкозы участвует глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, при действии которой кофермент НАД⁺ восстанавливается в НАДН (рис. 15). При этом (по аналогии с тестом Варбурга, о котором говорилось выше) НАДН поглощает свет с длиной волны 340 нм, а НАД⁺ нет (см. рис. 9). Концентрацию НАДН определяют фотометрически при длине волны 340 нм (УФ метод). Она пропорциональна концентрации глюкозы в пробе. Расчет проводят относительно калибровочного раствора глюкозы. В этом методе все ферментативные реакции также должны обеспечить полное превращение субстратов в продукты и НАД⁺ в НАДН, т. е. кинетические кривые должны выйти на плато за время инкубации. Для этого, как и в первой группе методов, врач-лаборант должен обеспечить инкубацию реакционной смеси при заданной температуре в течение времени не меньшем, чем указано в инструкции. Анализ одностадийный: готовят один рабочий реагент, содержащий все необходимое для ферментативных реакций.

Расчет концентрации аналита проводят относительно калибратора. Во всех этих методах, как и в кинетических методах вообще, следует четко по секундомеру фиксировать время между последовательными измерениями оптической плотности. Необходимо также следить, чтобы эти измерения проходили точно на линейном участке кинетической кривой; для этого требуется четко соблюдать время задержки, указанное в инструкции.

УФ кинетические методы

К ним относятся методы для определения мочевины, этанола и креатинина (см. табл. 5). Во всех этих методах на первом этапе происходит ферментативное превращение соответствующего аналита, в последнем звене ферментативных реакций происходит окисление НАДН в НАД⁺ в случае мочевины и НАДФН в НАДФ⁺ в случае креатинина, при определении этанола НАД⁺ восстанавливается в НАДН.

Скорость реакции окисления НАДН (или НАДФН соответственно) или восстановления НАД⁺ (для этанола) пропорциональна концентрации аналита в биологической жидкости. Для определения скорости реакции окисления или восстановления, как и в случае наборов колориметрических кинетических, проводят два или несколько фотометрирований через четко фиксированный интервал времени на линейном участке кинетической кривой при длине волны 340 нм. Таким образом определяют изменение оптической плотности в минуту и рассчитывают концентрацию аналита относительно калибровочного раствора мочевины, креатинина или этанола соответственно. Анализ одностадийный: готовят один рабочий реагент, содержащий все необходимые компоненты для ферментативных реакций, в том числе и кофермент.

При разработке ферментативных методов анализа по конечной точке свойства используемых в каскаде реакций ферментов тщательно изучают и оптимизируют состав реакционной смеси так, чтобы ферментативная реакция как можно быстрее выходила на плато и в то же время обеспечивала широкую линейную область определения аналита.

При разработке кинетических наборов условия реакции для используемых ферментов оптимизируют, а соотношение рабочий реагент/сыворотка устанавливают таким, чтобы линейный участок кинетической кривой был достаточно длинным (желательно, 3–5 мин), но не в ущерб чувствительности метода.

Для контроля правильности и воспроизводимости результатов определения аналитов коммерческими наборами реагентов на основе ферментативных методов следует пользоваться коммерческими контрольными сыворотками, аттестованными соответствующими методами.

4. ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ С ФЕРМЕНТАМИ

Приступая к работе, надо внимательно изучить и четко, осознанно выполнять прилагаемую к наборам инструкцию. Работая с ферментами (будь то ферментативные наборы для определения субстратов или активности ферментов или контрольные материалы, содержащие ферменты), следует соблюдать простые правила, вытекающие из общих для всех ферментов свойств.

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.

Необходимо строго соблюдать условия ферментативной реакции, указанные в инструкции: время и температуру инкубации, соотношение реагент/сыворотка.

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. Началом реакции считается момент добавления сыворотки (или стартера) в реакционную смесь, а также окрашивающего реагента, если реакция двухстадийная.

Для кинетических методов, когда анализ в нескольких пробах проводят последовательно, время начала реакции и равные промежутки времени между фотометрированиями следует точно фиксировать по секундомеру для каждой отдельной пробы. Так как измерения проводят на линейном участке кинетической кривой, то необходимо точно выдерживать время задержки (см. рис. 14, а, б).

Как следует из сказанного выше, определение активности фермента «по конечной точке» (с остановкой реакции) реально также является кинетическим методом. Поэтому очевидно, что время реакции в этом случае также необходимо фиксировать для каждой отдельной пробы. Так как определение, как правило, прово-

дят в нескольких пробах, сыворотку в реакционную смесь в параллельных пробах следует вносить через четко фиксированные по секундомеру промежутки времени, например через 30 с или 1 мин. Началом реакции считается внесение сыворотки в первую пробу из серии. По истечении времени реакции следует с таким же интервалом останавливать реакцию в параллельных пробах, т. е. вносить реагент, например щелочь, с интервалом 30 с или 1 мин соответственно. Таким образом, время реакции будет фиксировано для каждой отдельной пробы. Исключением из этого правила может быть только метод Райтмана-Френкеля. Так как время ферментативной реакции в этом методе – 1 ч, то допущенное отклонение во времени между параллельно определяемыми пробами при серийном запуске и остановке реакции будет относительно небольшим и внесет незначительную ошибку в конечный результат по сравнению с ошибкой самого метода.

Если проводится определение аналита ферментативным методом «по конечной точке», время реакции можно фиксировать для серии целиком, так как все реакции выходят на плато. Началом реакции считается момент добавления сыворотки или окрашивающего реагента, если анализ двухстадийный, в последнюю пробу из серии.

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 $\pm 0,1^\circ\text{C}$. В случае ферментативных методов анализа аналитов желательно, а при определении активности ферментов обязательно использовать водяную баню (водяной термостат). Так как теплопроводность воды значительно выше теплопроводности воздуха, водяной термостат быстрее и надежнее обеспечивает установку и поддержание заданной температуры реакционной смеси. Например, чтобы довести температуру 1 мл реакционной смеси до 37°C , в суховоздушном термостате ее необходимо выдержать 10 мин, а в водяной бане – 5 мин. Если время анализа выдерживают для каждой отдельной пробы, а не для серии целиком, технически с водяной баней работать удобнее.

5. Ни в коем случае нельзя изменять соотношение рабочий реагент/сыворотка. Его уменьшение в целях экономии может привести к сужению линейной области определения в случае определения активности фермента и к неполному превращению анали-

та в случае ферментативных методов анализа, т. е. к получению заниженных результатов. При увеличении соотношения рабочий реагент/сыворотка снижается чувствительность метода.

6. Также нельзя разбавлять рабочий реагент в целях экономии, так как при этом условия реакции (концентрация буфера, активаторов и т. д.) отклоняются от оптимальных, что приведет к занижению результатов анализа как в случае определения активности ферментов, так и в случае определения аналитов ферментативными методами.

7. Если концентрация фермента или другого аналита 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). Несоблюдение указаний может привести к серьезным ошибкам, так как в сыворотке присутствует огромное количество соединений, тем или иным образом влияющих на аналит и результат его определения (особенно это касается ферментов). Для получения точных и воспроизводимых результатов пробу вообще лучше не разбавлять, тем более что активность некоторых ферментов, например АЛТ и АСТ, непропорционально уменьшается при разбавлении. Однако не всегда линейная область определения набора позволяет охватить весь диапазон физиологических концентраций аналита. Надо стремиться разбавлять пробу минимально, желательно, в 2–3 раза (особенно при определении активности ферментов) и не больше, чем указано в инструкции. Разумеется, для разведения нельзя использовать маленькие аликвоты (10–20 мкл); чтобы уменьшить ошибку разведения, лучше взять хотя бы 100 мкл пробы.

8. Фотометрирование следует проводить в указанном в инструкции диапазоне длин волн, отклонение может существенно снизить чувствительность метода. В случае расчета концентрации аналита или активности фермента по коэффициенту экстинкции длина волны должна точно соответствовать указанной в инструкции. Так как коэффициент экстинкции – это оптическая плотность раствора вещества с концентрацией 1 мкмоль/л в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 1 см при данной длине волны, то для другой длины волны значение его будет иным и может значительно отличаться, что видно из рис. 9, 13, 16. В случае определения активности фосфатаз спектры субстрата (p-NPP) и продукта (p-NP)

перекрываются (рис. 16). Поэтому результат фотометрирования при длине волны < 405 нм будет неточным из-за поглощения неиспользованного субстрата.

9. Длина оптического пути кюветы для фотометрирования должна соответствовать указанной в инструкции. Использование кюветы с меньшей длиной оптического 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.

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

12. Следует тщательно мыть посуду, пипетки, наконечники и многократно ополаскивать их дистиллированной водой. Для мытья можно использовать только моющие средства, не содержащие биодобавки, так как в их состав входят протеазы, которые даже в следовых количествах могут разрушить ферменты в реакционной смеси. Особенно тщательно следует отмывать перекись водорода, используемую для обеззараживания пробирок и наконечников. Как указывалось выше, H_2O_2 является одним из продуктов сопряженных ферментативных реакций при определении глюкозы, холестерина, триглицеридов и т. д. Поэтому наличие экзогенной перекиси водорода зависит результаты анализа.

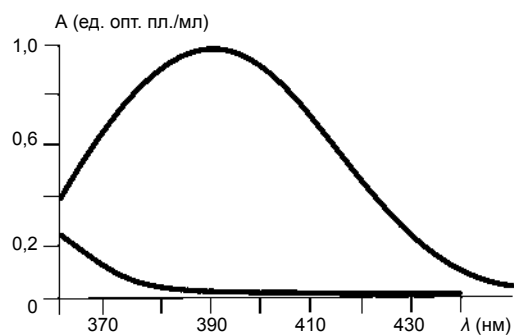


Рис. 16. Спектр поглощения:
1 – р-NPP; 2 – р-NP

13. Необходимо следить за качеством дистиллированной воды, используемой в процессе анализа. Избыток некоторых ионов, входящих в ее состав, может ингибировать ферменты.

14. 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. Наконечники к ним лучше повторно не использовать, особенно те, которыми проводили отбор сыворотки и затем обеззараживали перекисью водорода, по указанным выше причинам. При отборе калибратора использовать только новые наконечники.

15. Для получения достоверных результатов очень важен преаналитический этап. Рекомендуется как можно быстрее отделять сыворотку от сгустка (гемолиз, например, завьшает результаты определения КФ, ЛДГ, АЛТ). 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.

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

17. Следует регулярно проверять правильность и воспроизводимость результатов анализа по контрольным сывороткам, аттестованным соответствующими методами. В случае определения активности ферментов учитывать, каким рекомендациям соответствует используемый метод.

Многие из перечисленных выше правил применимы и к химическим методам анализа. Они просты в выполнении. В то же время их соблюдение гарантирует высокую точность и воспроизводимость результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Камышников В.С.* Справочник по клиническо-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. Минск: Беларусь, 2000
2. *Карпищенко А.И.* Справочник. Медицинские лабораторные технологии: в 2 т. СПб.: Интермедика, 1999
3. *Долгов В.В., Раков С.С.* Ферменты в лабораторной диагностике. Российская медицинская академия последипломного образования, ЭКО-МЕД-ПОЛ, 1999
4. *Bergmeyer H.U.* Methods of Enzymatic Analysis / In 3 Bd. Verlag Chemie, Weinheim, 1983
5. *Тиц Н.* Энциклопедия клинических лабораторных тестов. М.: Лабинформ, 1997
6. *Старостина В. К.* Ферменты в биохимическом анализе // Методическое пособие «Совершенствование качества работы клинико-диагностических лабораторий». Кольцово: Вектор-Бест, 2000.

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА
И ЗАКОНОМЕРНОСТИ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ5
2. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ15
3. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МЕТОДЫ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБСТРАТОВ29
4. ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ С ФЕРМЕНТАМИ38

Пособие для врачей

Галина Евгеньевна Яковлева

**ФЕРМЕНТЫ
В КЛИНИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ**

| | |
|----------|---------------|
| Редактор | В.И. Офицеров |
| Верстка | С.А. Сизикова |

Подписано в печать 26.04.2005. Формат 60×84/16.
Гарнитура Century Schoolbook Бумага офсетная. Усл. печ. л. 2,75.
Тираж 1000 экз. Заказ № 10

Типография ЗАО «Вектор-Бест». 630559 Новосибирская обл., пгт. Кольцово,
а/я 121, тел. (383) 227-67-68, 336-60-60