

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Северо-Осетинская государственная медицинская
академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации**

Кафедра биологической химии

**КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ КРОВИ. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ.
АНАЛИЗ ПРОТЕИНОГРАММ.
Учебно-методические рекомендации**

Владикавказ 2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

Белки присутствуют во всех тканях и биологических жидкостях организма. Практически все физиологические и патологические реакции в живых системах протекают при непосредственном участии белков. Количественный и качественный состав белков крови достаточно полно отражает состояние белкового обмена организма в целом, поэтому белки крови широко используются для диагностических целей.

По современным представлениям, плазма крови содержит до 300 различных белков, которые можно разделить на две основные группы: альбумины и глобулины. Соотношение между этими группами белков, а также количественные и качественные изменения индивидуальных белков внутри указанных групп имеют место при многих физиологических и патологических состояниях.

По выполняемой ими функции белки крови можно разделить на основные группы:

- транспортные / трансферрин, тироксин-связывающий белок/
- белки острой фазы / фибриноген, С-реактивный белок и др./
- комплемент / C_3 и C_4 компоненты/
- факторы свертывания / фибриноген, протромбин, фактор УШ/
- ферменты / амилаза, и др./
- ингибиторы протеиназ / α_1 -антитрипсин, антитромбин/
- белковые гормоны / инсулин, глюкагон, вазопрессин/
- иммуноглобулины / IgG и др./
- поддерживающие онкотическое давление /все, особенно альбумин
- поддерживающие буферную емкость / все белки /

Физиологическая функция белков плазмы состоит в поддержании коллоидно-осмотического давления, кислотно-основного состояния, в процессах катализа; транспорте гормонов, липидов, жирных кислот, жирорастворимых витаминов, пигментов, минеральных веществ. Они - носители природного и приобретенного иммунитета. Белки плазмы крови - неотъемлемые компоненты свертывающей и противосвертывающей системы.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ

Для анализа белков крови наиболее информативным является метод электрофореза. Белки, находящиеся в растворе имеют определенный электрический заряд, величина которого зависит от структуры молекулы белка и определяется наличием amino- и карбоксильных групп на поверхности молекулы. В электрическом поле под действием электрического тока молекулы движутся к полюсам. Изоэлектрическая точка большинства белков плазмы находится в диапазоне кислых значений pH и при электрофорезе в щелочном буфере они движутся к аноду. Распределенные таким образом по величине заряда и молекулярной массе белки могут быть зафиксированы и оценены количественно и качественно.

В настоящее время известно несколько методических модификаций метода электрофореза белков и в частности, белков крови. В практике клинко-диагностических лабораторий наиболее часто используют электрофорез белков

крови на ацетатцеллюлозной пленке, позволяющий получить 5 основных фракций : одну фракцию альбумина и 4 фракции глобулинов.

В щелочной среде в электрическом поле наиболее быстро перемещается альбумин затем α_1 , α_2 , β и γ глобулины.

Для работы может быть использовано типовое оборудование для биохимической лаборатории.

Для анализа берут свежую не гемолизированную сыворотку, полученную из взятой натощак крови. Сыворотку можно хранить не более 72 часов при температуре 2-8 С, предварительно определив общее содержание белка в образце биуретовым методом

ФРАКЦИИ БЕЛКОВ, ПОЛУЧАЕМЫЕ ЭЛЕКТРОФОРЕЗОМ И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА

Фракции глобулинов не являются гомогенными, в их составе разнообразные в функциональном отношении белки, которые в случае необходимости могут быть проанализированы отдельно.

- 7 -

Количественная характеристика этих фракций, процентное соотношение между ними достаточно стабильно при нормальном состоянии организма и определенное у здоровых доноров может быть взято за основу при анализе белкового состава крови при различных патологических состояниях.

В практике здравоохранения белковый состав крови определяется как в плазме, так и в сыворотке. В сыворотке крови из-за отсутствия фибриногена содержание общего белка меньше примерно на 2,5 г/л., по сравнению с плазмой. Присутствие фибриногена в плазме часто приводит к образованию выраженной полосы в области бета-глобулинов что может быть расценено как парапротеинемия.

Нормальные значения фракций как в абсолютном, так и в процентном выражении при анализе методом электрофореза зависят от типа носителя, на котором проводится разделение, применяемого красителя, типа аппаратуры. Исходя из этого, значения "нормы" при анализе белков крови методом электрофореза отрабатываются в каждой лаборатории и вносятся в собственный бланк.

Как было сказано выше, с помощью электрофореза на ацетате целлюлозы получают 5 стандартных фракций: альбумин и четыре фракции глобулинов α_1 , α_2 , β и γ . В ряде случаев удается обнаружить преальбумин - белок с наибольшей подвижностью. α - фетапротеин при онкологических заболеваниях может увеличиваться в 100 раз по отношению к норме и проявляться отдельной полосой между альбумином и зоной α_1 -глобулинов. Парапротеины, как правило, движутся при электрофорезе отдельной полосой / градиент М /.

Нормальные значения фракций белков в % при разделении на ацетате целлюлозы:

альбумин - 48 - 61%

α_1 -глобулин 2,5 - 5,0%

α_2 - глобулин 8,0- 11,0%

β - глобулин 11,0 - 15,0%

γ - глобулин 16,0 - 25,0%

Характер изменений основных фракций белков крови, их количественные и качественные характеристики позволяют дать общее заключение о наличии, интенсивности и степени выраженности патологического процесса.

Альбумин. На его долю приходится до 65% всего белка сыворотки крови. Основные функции альбумина: связывание воды, обеспечивающее значительную долю онкотического давления /80 %/. Альбумин осуществляет транспорт ионов калия, магния, билирубина, свободных жирных кислот, лекарственных соединений, гормонов щитовидной железы. Он источник пластического материала.

Гипоальбуминемия наблюдается вследствие потери альбумина при нефротическом синдроме, гастроэнтерите, кровотечении; при повышении катаболизма /травма, инфекции, сепсис, опухоли, гипертиреоз/; при понижении синтеза /цирроз и жировая дистрофия печени, недоедание/. При ожогах, токсикозах, асците, в послеоперационном периоде.

Гиперальбуминемия является результатом острого обезвоживания, приема анаболических стероидов. Нормальное содержание 37 - 55 г/л в сыворотке крови. Электрофоретическая подвижность альбумина меняется при его участии в комплексообразовании, особенно с лекарственными препаратами.

Фракции α_1 , α_2 - глобулинов содержат значительное количество индивидуальных белков, которые могут быть использованы для диагностики. При электрофорезе увеличение содержания фракций связано с развитием воспалительного процесса. Фракция α_1 - глобулинов часто является мерилем интенсивности процесса воспаления. Количественные изменения этих фракций отражают нарушения равновесия синтез-распад: снижение содержания этих белков при электрофорезе связано с заболеваниями печени, приводящими к уменьшению синтетических процессов в органе, тяжелыми дистрофическими процессами, а возрастание содержания белков этой фракции – результат развития острых воспалительных процессов, обострения инфекционных процессов, наличия опухолевого роста. Увеличение α_1 – глобулинов характерно для хронического гепатита, длительного лечения эстрогенами, беременности, а фракция α_2 глобулинов – часто бывает увеличена за счет гаптоглобина.

Фракция β - глобулинов содержит значительное количество липопротеидов, белков, участвующих в обмене липидов и их транспорте. Нарушение нормального содержания белков этой фракции свидетельствует о нарушениях обмена липидов и часто изменения на электрофореграмме, отмечаемые для этой фракции белков, соответствуют изменениям фракций α -глобулинов. Возрастание уровня β -глобулинов, может быть при железодефицитной анемии, за счет увеличения трансферрина.

Фракция γ - глобулинов представлена белками, обеспечивающими иммунитет организма. Эти белки синтезируются и секретируются В-лимфоцитами. В настоящее время известно 5 классов иммуноглобулинов (Ig)

БЕЛКОВЫЕ ФРАКЦИИ КРОВИ

Б Е Л О К Концентра ция в Норме в г/л	Физиологичес кая функция	Повышение Концентраци и	Понижение концентрации
Альбумин (65кД) 35-55г/л 65% *52% 46,9- 61,4 **58% 53,9-62,1	Поддержание коллоидно- ос- мотического давления, связывание и транспорт ионов, ЖК, гормонов, лекарственны х препаратов, токсинов резерв АК	Дегидратация , появление преальбумино в /миелома, нефротически й синдром, хронич. пиелонефрит, острый лейкоз, злокач. новообразова ния, воспалит. процессы/	Нарушение синтеза и повышение распада при гемодиллюции, за-болевания печени, хронический гепатит, длитель-ные механической желтухи, опухоли печени, токсич. гепатиты, хрон. заболевания почек с нефротич. синдромом, ожог, кровотечения, тиреотоксикоз ы, генетически обусловленные заболевания

α_1 глобулины 2,3-4,2г/л 2-5% *3,3 2,2-4,2 **3,9 2,7-5,2	гетерогенная группа белков с различными физиологическими функциями большая группа белков острой фазы	Остро воспалительные процессы, хронич. заболевания, поражения печени, обострение инфекционных заболеваний, хронич. гепатиты, механич. желтухи, опухоли печени, рожистое воспа-	тяжелые дистрофические процессы в печени, цирроз печени, лимфолейкоз, миелома, болезни легких, гемолитическая анемия, мегалобластическая анемия, наследственные нарушения синтеза, ление, сепсис, ревматоидный артрит, беременность, сахарный диабет новообразования
α_2 глобулины 5,4-10,0г/л 7-13% *9,4% 7,9-10,9 **8,8% 7,4-10,2	гетерогенная группа белков с различными физиологическими функциями большая группа белков острой фазы	Остро воспалительные процессы, хронич. заболевания, поражения печени, обострение инфекционных заболеваний, хронич. гепатиты, механич. желтухи, опухоли печени, рожистое воспа-	тяжелые дистрофические процессы в печени, цирроз печени, лимфолейкоз, миелома, болезни легких, гемолитическая анемия, мегалобластическая анемия, наследственные нарушения синтеза, ление, сепсис, ревматоидный артрит, беременность, сахарный диабет новообразования
Бета-глобулины 6,0-12,0 г/л 8-15% 14,3% 10,2-18,3 ¹ **13,0% 11,7-15,3	транспорт липидов участие в обмене липидов; ряд белков со специфическими функциями	хрон. инфекции, цирроз печени, малярия, злокачественные новообразования, системные заболевания крови, миеломы, мех. желтухи, железодефиц	Гипо- β -липопротеинемия, голодание, болезни печени, нефротический синдром, ХПН, гастроэнтеропатия, злокачественные новообразования

¹ содержание фракций белков при окраске: Пунцовый С, Бромфеноловый синий Приказ МЗ СССР №1175 от 21.11.79

		итная анемия, гиперлипиде мия, амилоидоз	
γ глобулины 6,0-16,0 г/л 12-22% *21% 17,6- 25,4 **18,5% 15,6-21,4	обеспечение гуморальной защитной реакции Содержит все классы Ig IgG (150кД) IgA (180кД) IgM (900кД) IgD (170кД) IgE (190кД)	бактериальны е и септические инфекции, паразитарные болезни, стрепто- и стафилококк овые инфекции, пиодермия коллагенозы, опухоли гепатиты, циррозы печени, хрон. инфекции, макроглобули немия, множественн ая миелома.	потери белка через почечный фильтр /болезни почек, шок, ожоги, экземы, гноящиеся раны, кровоотечения, терапевтически е поражения клеток иммунной системы/ длительные инфекции, лечение цитостатиками и стероидными гормонами, пожилой возраст

У детей с частыми инфекциями, бронхиальной астмой, хроническим обструктивным бронхитом и у взрослых в случаях неэффективности лечения противовоспалительными препаратами желательно проводить определение подклассов IgG. Их 4, они различаются по функции и по структуре тяжелых цепей. Заболевания, сопровождающиеся увеличением концентрации подклассов IgG: аллергия, астма, экзема, дерматит, рассеянный склероз; снижение концентрации: аутоиммунные заболевания /бронхиальная астма у детей, системная красная волчанка/, иммунодефициты /ВИЧ-инфекция, химиотерапия, высокие дозы кортикостероидов/; инфекции /средний отит, возвратные легочные инфекции, бронхэктазы/; другие заболевания (нефротический синдром, алкогольный цирроз печени, конечная стадия почечной недостаточности).

Гипогаммаглобулинемия. Физиологическая встречается у новорожденных, патологическая - как у детей, так и у взрослых может быть как врожденной, так и приобретенной и сопровождается иммунодефицитом. Наиболее частая врожденная патология - избирательный дефицит IgA. Встречается у детей в конце первого года жизни, когда исчезает материнский иммунитет (пневмонии, синуситы, отиты, сепсис, понос, вирусный гепатит). Лабораторный признак - снижение СОЭ. Приобретенные нарушения иммунитета с уменьшением Ig могут возникать после потерь белка /обширные ожоги, заболевания почек/; тяжелых травм, серьезных оперативных вмешательств, злокачественных поражений лимфоплазмочитарной системы /миелома, лимфолейкозы, миелолейкоз/, а также при СПИДе.

Гипергаммаглобулинемия - возможна при повышенном синтезе антител. В этом случае нарастает содержание всех классов Ig с преобладанием IgG. Ig увеличиваются при всех бактериальных инфекциях /стафило-, стрепто-, пневмококковых/, и сепсисе, рожистом воспалении, скарлатине, ангине, инфекционном мононуклеозе, хронических инфекциях, паразитарных заболеваниях /малярия, эхинококкоз печени, легких, токсоплазмоз, глистная инвазия/.

Патологическое увеличение концентрации характерно для аутоиммунных заболеваний /ревматоидный артрит, системная красная волчанка/, и для хронических заболеваний печени, имеющих аутоиммунную природу /хронические гепатиты, циррозы.

ХАРАКТЕР И ПРИЧИНЫ ИЗМЕНЕНИЙ БЕЛКОВ КРОВИ

Для общей оценки полученных результатов при анализе белков крови регистрируется одно из состояний белкового обмена в организме на момент обследования:

гиперпротеинемия - повышенное содержание белков по отношению к норме;

гипопротеинемия - уменьшение содержания белков по отношению к норме;

диспротеинемия - изменение соотношения между основными фракциями белков крови, что хорошо видно по результатам, получаемым при электрофорезе.

диспротеинемия - может быть зарегистрирована при неизменном показателе содержания общего белка в крови. При анализе электрофореграмм может быть получено значимое в диагностическом отношении нарушение количественных характеристик отдельных фракций и нарушение показателя общего белка за счет гетерогенности внутри одной из фракций.

Концентрация белка в крови определяется тремя основными факторами:

- количеством синтезируемого за единицу времени и поступающего в -кровяное русло белка;
- скоростью его распада или удаления;
- объемом плазмы крови.

Нарушение равновесия между процессами синтеза-распада, как и изменение объема циркулирующей крови и объема внутрисосудистого пространства,

приводит к гипо/гипер и диспротеинемии независимо от патогенеза изменений, и находит свое отражение в индивидуальном типе распределения белков крови при их электрофорезе.

На концентрацию белков плазмы крови могут влиять как физиологические факторы (возраст, пол, интенсивность физической нагрузки, питание, сон, беременность, лекарственные препараты, экология), так и патологические:

-потери через поврежденный орган, например, через кишечник при нефротическом

синдроме;

- нарушения синтеза (при заболевании печени);
- изменение объема циркулирующей крови (в результате гипер- и гипогидратации при перераспределении между водными пространствами организма).
- катаболизм (усиление при воспалении)
- компенсаторные механизмы (увеличение количества высокомолекулярных белков при нефротическом синдроме)

Повышение содержания белков крови, или гиперпротеинемия, может возникать за счет:

- дегидратации - потери части внутрисосудистой жидкости, выход ее в межклеточное пространство, потеря воды через кишечник. Такое состояние развивается при ожогах, травмах, несахарном диабете, холере и т.д.
- увеличения одного или нескольких специфических белков /острые и хронические инфекции, аутоиммунные болезни, парапротеинемические гемобластомы, миеломная болезнь, болезнь Вальденстрема, "болезнь тяжелых цепей", лимфогранулематоз, саркоидоз, активный хронический гепатит/
- цирроза печени без выраженной печеночно-клеточной недостаточности;
- при паразитарных заболеваниях - малярия, токсоплазмоз -содержание белков может достигать 100-120 г/л.

Гиперпротеинемия не может быть результатом усиленного синтеза альбумина, поэтому гиперальбуминемия указывает на дегидратацию или артефакты /стаз крови при венопункции/. Заподозрить гиперпротеинемию можно при изменении СОЭ, но и нормальное СОЭ не исключает патологии. (Повышение в плазме фибриногена, иммуноглобулинов, гипоальбуминемия и анемия приводят к увеличению СОЭ. Низкое СОЭ может быть при увеличении вязкости, при криоглобулинемиях или дегидратации).

Незначительная абсолютная гиперпротеинемия встречается при инфекционном или токсическом воздействии на ретикулоэндотелиальную систему, в клетках которой синтезируются многие фракции , входящие в состав глобулинов , в частности, при хроническом полиартрите,

Стойкая гиперпротеинемия может быть при миеломной болезни, макроглобулинемии Вальденстрема за счет образования патологических белков парапротеинов. Поэтому гиперпротеинемия является показанием для анализа белков крови методом электрофореза с целью выявления этих форм патологии.

Причиной снижения концентрации белков крови -гипопротеинемии - может быть:

- нарушение синтеза белка вследствие дефицита ферментов /голодание, энтериты, панкреатиты, болезни печени, в том числе, паренхиматозные гепатиты, длительное

лечение кортикостероидами, алкоголизм; прием пищи, бедной животными белками/;

- недостаточное поступление белков /язва привратника, голодание/;
- недостаточность переваривания и всасывания /дизентерия, гастроэнтериты/;
- острые и хронические кровопотери белка /гломерулонефрит и другая патология почек, сахарный диабет, транссудаты и экссудаты, асцит, перитонит, плеврит, ожоги, кровотечения/;
- повышенный распад белка /тиреотоксикоз, длительная физическая нагрузка, длительная лихорадка, травмы, злокачественные опухоли, сепсис/;
- гипердигидратация;
- понижение содержания белков в плазме крови может быть зарегистрировано у женщин в период лактации и на поздних сроках беременности.

Диспротеинемия - нарушение соотношений основных фракций белков крови почти всегда имеет место при развитии патологического процесса.

Диспротеинемия может быть как за счет большой группы белков - глобулинов, так и за счет индивидуального белка, изменение которого специфично для патологического процесса. Электрофорез белков крови позволяет установить наличие диспротеинемии и дает возможность определения группы белков, вызывающих это состояние

Диспротеинемия может присутствовать при гипо- и гиперпротеинемии за счет одновременного изменения количества отдельных групп белков или сопровождать указанные изменения крови при нарушении равновесия синтеза-распад белков и выраженном отклонении белкового обмена от нормы.

Аналогичная картина возникает при потерях белка с мочой при патологии почек или через желудочно-кишечный тракт, а также при голодании, кахексии, хронических поражениях печени, затрагивающих белок-синтезирующий аппарат.

Отклонения от нормы в содержании отдельных фракций белков могут быть за счет наследственных дефектов обмена, связанных с нарушением процессов на генетическом уровне.

Изменения концентрации белков крови могут носить как относительный, так и абсолютный характер. Относительное изменение содержания белков регистрируется при изменении объема плазмы /крови/. Известно, что гидремия приводит к относительной гипопроотеинемии, а дегидратация /обезвоживание/ - к относительной гиперпротеинемии. Дегидратация скрывает абсолютную гипопроотеинемия, так как при данном сочетании показатели концентрации белка в плазме крови не всегда отличны от нормы. Для оценки абсолютных и относительных изменений содержания белка в плазме необходимо определить либо - объем плазмы, либо - гематокрит.

ТИПЫ ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММ И ИХ ОСОБЕННОСТИ

Изменение содержания отдельных белков плазмы крови в процентном отношении по сравнению с нормой особенно важно для диагностики и наблюдения за патологическими процессами в развитии. При острых воспалительных процессах в организме (пневмония, острые инфекционные заболевания, сепсис, полиартрит) характерно, помимо уменьшения %-ной доли альбуминов, возрастание доли α_1 , α_2 -глобулинов. При нефрозах, нефритах, нефросклерозах отмечается значительное уменьшение альбуминов и возрастание α_2 , β -глобулинов на фоне

умеренного понижения γ – глобулинов. Для гепатитов, токсических поражений печени, гемолитических процессов характерно умеренное понижение альбуминов, увеличение γ - глобулинов и резкое увеличение β – глобулинов, для механических желтух - умеренное увеличение α_2 , β и γ – глобулинов. Это делает электрофоретический анализ белков крови особенно актуальным для диагностики развивающегося процесса на основе конкретных изменений, как в основных группах белков, так и специфических белков в их составе.

По внешнему виду, по характеру распределения фракций после электрофореза кривые распределения белков крови могут быть представлены в виде определенных типов электрофореграмм в зависимости от общих признаков, характерных для ряда патологических процессов. Типы электрофореграмм /протеинограмм/ объединяют сходные изменения в распределении белков при различных патологических состояниях.

Протеинограммы, характерные для заболеваний, связанных с острыми воспалительными процессами. Этот тип электрофореграмм характеризуется уменьшением содержания фракции альбумина, выраженность которой соответствует распространенности и остроте процесса. Одновременно характерным для этого типа электрофореграмм является возрастание уровней фракций α_1 и α_2 - глобулинов, с которыми связаны основные группы белков так называемой острой фазы. На поздних сроках может быть зарегистрировано увеличение содержания γ -глобулинов. Может быть увеличено содержание β -глобулинов. Такой тип протеинограммы характерен для начальных стадий пневмонии, острых полиартритов, экссудативного туберкулеза, острых инфекционных заболеваний, сепсиса, обширного инфаркта миокарда и др.

Протеинограммы, характерные для хронических воспалительных процессов.

Протеинограмма таких заболеваний показывает умеренное уменьшение фракции альбумина, при увеличении пиков α_2 и γ - глобулинов, т.к. при переходе заболевания в хроническую форму снижается образование ряда фракций белков острой фазы, что приводит к выраженному перераспределению этого типа белков на электрофореграмме. Могут быть увеличены β -глобулины. Этот тип распределения белков соответствует поздней стадии пневмонии, хроническому туберкулезу легких, хроническому эндокардиту, холециститу, циститу и др.

Протеинограммы, характерные для гепатитов, отражает умеренное уменьшение содержания альбумина, увеличение уровня γ - глобулинов и менее выраженное β - глобулинов. Этот тип электрофореграмм встречается при состояниях токсического повреждения печени, гепатитах, гемолитических процессах, может быть при злокачественных новообразованиях, дерматозах.

Протеинограммы, соответствующие циррозу печени. Отмечается значительное снижение содержания альбуминов при сильном увеличении γ -глобулиновой

фракции, указанный тип протеинограмм выявляется при циррозах печени, сепсисах, при некоторых формах полиартрита и коллагенозов.

Протеинограммы, характерные для механической желтухи. Отличается комплексом изменений; уменьшение уровня альбуминов и умеренное увеличение содержания α_2 , γ и β - глобулинов. Этот тип электрофореграмм присущ обтурационной желтухе, а также желтухам, вызванным развитием рака желчевыводящих путей и головки поджелудочной железы.

Протеинограммы характерные для нарушения функции почечного фильтра. Значительное уменьшение содержания альбуминов регистрируется на фоне повышения концентрации α_2 и β - глобулинов при умеренном снижении уровня γ - глобулинов. Этот тип протеинограмм свойственен генуинному или липоидному нефрозам, нефритам, кахексии, токсикозам беременности, а также ряду других заболеваний.

Протеинограммы, соответствующие злокачественным новообразованиям. Обнаруживается резкое снижение содержания альбуминов при значительном увеличении всех глобулиновых фракций. Наибольшего пика подъема достигает уровень γ - глобулинов. Этот тип протеинограмм сопровождает метастатические новообразования с различной локализацией первичной опухоли.

Протеинограммы, характерные для γ - глобулиновых плазмодитом. Отличаются значительным уменьшением содержания альбуминов α_2 и β - глобулинов при увеличении концентрации γ - глобулинов. Они типичны для макроглобулинемии и некоторых ретикулезозов.

ВЛИЯНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ НА РЕЗУЛЬТАТ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА.

Анализ белкового спектра плазмы крови методом электрофореза позволяет выявить закономерную связь между качественными и количественными изменениями в их распределении и динамикой патологического процесса, зависящего не только от природы заболевания, но и от особенностей его проявления.

В настоящее время известен ряд индивидуальных белков, изменения которых характерны для определенных патологических процессов и именно они могут влиять на характер получаемых в результате электрофореза кривых.

Белки острой фазы

Понятие белки острой фазы объединяет большую группу белков (до 30) участвующих в формировании ответа организма на повреждающее воздействие, развитие воспалительного процесса, действие медиаторов воспаления /кинины, биогенные амины, простагландины/. В эту группу входят белки, связанные с процессами восстановления гомеостаза всего организма в целом. Они могут быть

представлены по группам в связи с уровнем увеличения их содержания в зависимости от стадии воспалительного процесса и временного интервала их появления в крови и наибольшей информативности. Эти белки способны изменять характер распределения и величину пиков основных фракций белков на электрофореграмме.

Содержание белков четвертой группы может оставаться в пределах нормальных значений, но эти белки принимают участие в реакциях, сопровождающих острую фазу воспаления / α 2-макроглобулин, иммуноглобулины/.

Пятая группа белков – это белки, содержание которых в условиях острого воспалительного процесса может быть ниже нормы. Уменьшение концентрации отдельных белков пятой группы в острый период на 30-60% может быть обусловлено снижением синтеза, увеличением их потребления, изменением их распределения в организме .

Несмотря на различие биологических функций, все эти белки выполняют важную роль в районе повреждения и непосредственно участвуют в реакциях, направленных на удаление повреждающего фактора, локализацию очага повреждения, стабилизацию процессов, восстановление нарушенной структуры

Белки острой фазы.

ГРУППЫ БЕЛКОВ (характеристика изменений)	БЕЛКИ входящие в группу	Концентрация в сыворотке в норме (г/л)
I - (увеличение концентрации в 20- 100раз в течение 6-12 часов)	С-реактивный белок (СРБ) амилоидный белок А сыворотки (SAA)	<0.005 0.001- 0.03

II – (умеренное увеличение концентрации (в 2-5 раз) в течение 24 часов)	α_1 -антитрипсин	1.4-3.2
	α_1 -кислый гликопротеин	0.4-1.3
	гаптоглобин	0.5-3.2
	фибриноген	1.8-3.5
III – (незначительное увеличение концентрации (20-60%) в течение 48ч)	C3-компонент комплемента	0.5-0.9
	C4-компонент комплемента	0.1-0.4
	церулоплазмин	0.2-0.5
IV – (уровень может оставаться в пределах нормальных значений)	IgG	8-20
	IgA	0.9-4.5
	IgM	0.6-2.5
	α_2 - макроглобулин	1.2-3.2
V – (уровень может снижаться в течение 12-48 часов)	альбумин	37-53
	преальбумин	0.25-0.45
	трансферрин	2.3-4.3
	фибронектин	<0.3
	АпоА-липопротеин	1.0-2.2

Индивидуальные белки

Ряд белков, изменения содержания которых характерны для развития патологического процесса, могут изменить картину распределения основных белков крови при электрофорезе. При необходимости они могут быть определены дополнительно иммунологическими методами.

Преальбумин и ретинол-связывающий белок /РСБ/. Относятся к транспортным белкам крови. Норма до 0,4г/л. Преальбумин - показатель нарушения синтетической способности печени, маркер недостатка питания, дефицита аминокислот. РСБ увеличивается при хронической почечной недостаточности, снижается при заболеваниях печени, погрешностях и недостатке питания.

α_1 - антитрипсин - белок острой фазы, является основным ингибитором сериновых протеаз. Генетически обусловленное снижение содержания α_1 - антитрипсина является причиной предрасположенности к бронхопульмональным заболеваниям /эмфизема, хронический бронхит, бронхоэктатическая болезнь/. В детском возрасте дефицит α_1 - антитрипсина – служит причиной холестаза и цирроза печени, желтух. Белок имеет несколько изоформ, которые можно получить при помощи электрофореза. Норма 1,4-3,2г/л.

α_1 - кислый гликопротеин /орозомукоид/. Связывает и транспортирует прогестерон и тестостерон; влияет на адгезию тромбоцитов. Резкое повышение его в послеоперационном периоде указывает на локальную инфекцию, абсцесс или сепсис. Концентрация этого белка может быть увеличена при ревматоидном артрите, системной красной волчанке, метастазах опухолей, инфаркте миокарда; снижена - при голодании, тяжелых поражениях печени, белок-теряющих энтеропатиях. Норма: 0,4-1,3 г/л.

α_2 - макроглобулин - ингибирует протеолитические ферменты, синтезируется вне печени. Содержание белка увеличено при невротическом синдроме, циррозе, микседеме, сахарном диабете, бронхопневмонии, беременности; снижено при ревматическом полиартрите, остром панкреатите, язве желудка и 12-типерстной кишки, инфаркте миокарда, активном фибринолизе, почечно- и желчекаменной болезнях. Норма: 1,2-3,2 г/л.

α_1 – микроглобулин. В сыворотке образует комплексы. Используется для оценки степени клубочковой фильтрации.

α - фетопротеин - фетальный белок. Маркер злокачественных опухолей – первичного рака печени и тератобластомы яичников; при беременности является маркером нормального развития эмбриона и используется для пренатальной диагностики. Увеличение содержания α -фетопротеина в крови может проявиться на электрофореграмме в виде отдельного пика между альбумином и α_1 –

глобулином. При циррозе печени алкогольного происхождения, кривая изменений этого белка в динамике имеет пилообразный характер.

α_2 - микроглобулин. Определяется в сыворотке и в моче. В сыворотке - для контроля течения и лечения лимфопролиферативных заболеваний /лимфогранулематоз, хронический лимфолейкоз, множественная лимфома/, в сыворотке и в моче определяется для оценки функции почек. Почечная недостаточность, при которой клубочковая фильтрация менее 80 мл/мин, ведет к его увеличению в сыворотке и снижению в моче. Норма: в сыворотке менее 2,4 мг/л, в моче до 250 мкг/л.

Миоглобин - маркер инфаркта миокарда. При инфаркте миокарда увеличение его концентрации в сыворотке обнаруживается уже через два часа после приступа боли. Уровень миоглобина в сыворотке, увеличен при краш-синдроме, эпилептических припадках, лихорадке, почечной недостаточности, лихорадках при инфекциях /грипп, тиф, столбняк/, мышечной патологии, включая наследственные формы.

Тропонин-Т, Тропонин I - структурные белки поперечно-полосатой мышцы. В норме в плазме отсутствуют. Появляются в сыворотке при повреждении мышц. Высококчувствительные и высокоспецифичные маркеры инфаркта миокарда.

Церулоплазмин - медьсодержащий белок, обладающий свойствами фермента. Депонирует ионы меди, окисляет двухвалентное железо в трехвалентное. Норма 300-580 мг/л. Повышен при реакциях острой фазы, во время беременности, у лиц, принимающих эстрогенсодержащие контрацептивы, при холестазах из-за нарушения выведения меди. Увеличение содержания специфично при меланоме и шизофрении. Снижение содержания отмечается при болезни Вильсона-Коновалова, а также при невротическом синдроме, энтеропатии с потерей белка, тяжелых поражениях печени.

Гаптоглобин связывает и транспортирует свободный гемоглобин- α в клетки ретикулоэндотелия. Содержание снижается при поражениях паренхимы печени, гемолитической анемии, и увеличивается при острых воспалительных процессах, сахарном диабете. Норма до 0,35 г/л.

Гемпексин - гемсвязывающий сывороточный α -гликопротеид. Норма 0,5 г/л. Увеличен при гемолитической анемии, сахарном диабете, мышечной дистрофии, злокачественных новообразованиях.

Трансферрин – основная функция - перенос железа к клеткам. Оценка содержания трансферрина в плазме используется для дифференциальной диагностики анемий. Повышение его содержания отмечается при скрытом железодефиците. Уменьшение концентрации при реакции острой фазы, неэффективном эритропоэзе

/талассемия, мегалобластные анемии/, гемохроматозе, потерях белка и нарушениях его синтеза .

Ферритин. Концентрация этого белка в крови соответствует общим запасам железа в организме. Содержание в сыворотке меньше 15 мкг/л указывает на недостаток железа. Повышение уровня встречается при гипохромной анемии, гемо-трансфузии, гемохроматозе, неэффективном эритропоэзе.

С-реактивный белок /СРБ/ - основной белок острой фазы, содержание в норме менее 0,005 г/л. Синтезируется в печени, при тяжелых воспалениях синтез возрастает в тысячу раз /в первые 6-12 ч./, быстро снижается при эффективном лечении или переходе процесса в хроническую форму. Используется для диагностики сепсиса у новорожденных. В первый день жизни уровень СРБ повышен у 80 % инфицированных новорожденных. Может быть использован для дифференциальной диагностики бактериальных и вирусных инфекций.

Высокое содержание СРБ наблюдается при: системных васкулитах, тяжелых бактериальных инфекциях (сепсис, пневмония, пиелонефрит, послеоперационные инфекции), активном ревматоидном артрите, активной болезни Крона, тромбозе глубоких вен, остром панкреатите, метастазирующих некрозирующих опухолях.

Фибронектин - концентрация в плазме - до 6,5 мг/л. Повышение концентрации в плазме регистрируется у больных со злокачественными новообразованиями различной локализации, наиболее часто при опухолях печени, поджелудочной железы или желчевыводящих протоков.

Фибриноген - нормальная концентрация в крови 1,8-5 г/л. Повышение его содержания сопровождает острые и хронические воспалительные процессы: болезни почек /острый и хронический пиелонефрит, гломерулонефрит, невротический синдром/. Содержание этого белка возрастает при лихорадке, воспалении, некрозе тканей, инфекционных заболеваниях, травмах, ожогах, обширных хирургических вмешательствах, коллагенозах; остром инфаркте миокарда, лучевой болезни, некоторых злокачественных опухолях, особенно при раке легкого.

Гипофибриногенемия наблюдается при тяжелой почечной недостаточности, циррозе печени, отравлении гепатогенными ядами, состоянии после обильных кровотечений, ожогов, а также при лейкозах, метастазах опухоли в костный мозг, употреблении ряда лекарств.

Комплемент. Состоит из, большой группы сывороточных глобулинов; система комплемента вместе с антителами и специализированными клетками участвует в защите организма от инфекций. С₃- и С₄ - компоненты комплемента – белки острой фазы. Дефицит компонента С₃ - сопровождает аутоиммунные заболевания со значительным полиморфизмом, особенно часто с гломерулонефритом и системной

красной волчанкой, возвратные инфекции; дефицит компонента C_4 – характерен для болезней иммунных комплексов: системная красная волчанка, полимиозит, гломерулонефрит.

Парапротеины /моноклональные иммуноглобулины/. Это Ig или их фрагменты, не способные выполнять функцию антител. Парапротеины определяются при электрофорезе белков по наличию узкого пика /М-градиент/ обычно в зоне γ – глобулинов, однако полоса М-градиента может мигрировать от γ – глобулинов до альбумина. Встречаются двойные М-градиенты. Парапротеины регистрируются при множественной миеломе, и при таких заболеваниях иммунной системы как макроглобулинемия Вальденстрема, острый плазмобластный лейкоз, болезни тяжелых цепей, лимфомы с парапротеинемией.

В случае множественной миеломы при выявлении на электрофорезе сыворотки парапротеинов обязательным является электрофоретическое исследование мочи /появление белка Бен-Джонса /.

Криоглобулины - патологические белки плазмы, обладающие повышенной способностью к коагуляции - превращение в желеобразное состояние при температуре ниже 37°C . Они могут появиться при миеломе, макроглобулинемии Вальденстрема, хроническом лимфолейкозе, инфекционных заболеваниях /сифилисе, мононуклеозах, туберкулезе/, вирусных аутоиммунных заболеваниях, циррозе печени, коллагенозах.

Структура и свойства ферментов.

Ферменты – это белки, участвующие в процессах, протекающих в органах и системах живых организмов, выполняя роль катализаторов. Ферменты обеспечивают многообразие биохимических реакций и жизнедеятельность организмов.

Будучи белками, ферменты обладают всеми особенностями, присущими этому классу соединений. Пространственное формирование структуры фермента и свертывание молекулы в виде спирали обеспечивает структуру молекулы, которая поддерживается за счет водородных, дисульфидных, ионных и полярных связей. у. Ряд ферментов, как и белков, имеет четвертичную структуру. В этом случае молекула фермента состоит из нескольких субъединиц, каждая из которых обладает первичной, вторичной и третичной структурой.

По своему строению ферменты могут быть простыми и сложными белками. Простые ферменты при гидролизе дают только смесь аминокислот; сложные, кроме аминокислот в своем составе имеют компонент небелковой природы. Белковая часть сложного фермента носит название – «апофермент»; небелковая – «кофермент». Апофермент и кофермент в отдельности не обладают ферментативными свойствами. Только объединившись в одну молекулу, они обладают каталитической способностью и могут работать в качестве фермента. В

сложных ферментах кофермент часто представлен витамином или его производным. Поэтому гиповитаминоз всегда приводит к нарушению обменных процессов за счет дефекта ферментных систем.

В организме ферменты выполняют роль биологических катализаторов и обладают основными свойствами истинных катализаторов:

1. ферменты активируют соединения и делают возможным протекание реакций, которые или идут с очень низкой скоростью или не идут без участия катализатора;
2. сам фермент в процессе реакции не изменяется;
3. для протекания ферментативной реакции необходимо малое количество фермента.

В процессе работы фермент образует с субстратом (преобразуемым соединением) фермент-субстратный комплекс.



На поверхности молекулы фермента расположены «центры связывания». Каждый центр связывания – это участок молекулы, имеющий определенную последовательность специфичных аминокислот обеспечивает образование фермент-субстратного комплекса. В результате такого взаимодействия фермента с субстратом в молекуле субстрата происходит ослабление внутримолекулярных связей и повышение уровня энергии, что служит началом преобразования структуры субстрата. Формирование фермент-субстратного комплекса – это начальная стадия ферментативного процесса, протекание которого определяется временем образования этого комплекса, концентрацией субстрата и временем образования продукта реакции (конечного продукта). С увеличением концентрации субстрата скорость реакции возрастает до определенной величины, после чего становится постоянной.

Скорость ферментативной реакции и ее связь с субстратом может быть охарактеризована с помощью константы Михаэлиса-Ментен (K_m), так как она может служить показателем активности фермента и катализируемой им реакции. Константа Михаэлиса-Ментен численно равна величине субстрата, при которой скорость ферментативной реакции – половина от максимальной. При низких концентрациях субстрата скорость ферментативной реакции изменяется прямо пропорционально содержанию субстрата, а при высоких концентрациях субстрата она достигает максимума и не меняется, что является результатом насыщения фермента субстратом.

Помимо центров «связывания» на поверхности молекулы фермента расположены – центры «активации» – участки аминокислот, имеющих определенную последовательность и позволяющих за счет взаимодействия с ними изменять активность фермента. Активация фермента может быть также достигнута путем изменения пространственной формы его молекулы – за счет конформационных изменений. Конформационные изменения могут переводить молекулу фермента из неактивного состояния в активное за счет отщепления части молекулы, присоединения, наиболее полного раскрытия и доступности центра связывания.

Одним из важных свойств ферментов является их специфичность по отношению к субстрату, которая может быть абсолютной и относительной.

Ферменты, обладающие абсолютной специфичностью способны катализировать превращения только одного соединения; обладающие групповой специфичностью – соединения разные по составу, но относящиеся к одному виду. При относительной специфичности ферменты могут катализировать превращения близких по строению соединений. Некоторые ферменты обладают стереоспецифичностью. Они способны катализировать превращение только определенных стереоизомеров: D-изоформы, но не L-изоформы, или наоборот.

Для многих ферментов характерно наличие «изоферментов». Изоферменты – это группа ферментов, катализирующих одну и ту же реакцию, но различающихся по ряду физико-химических свойств. Эти различия включают: аминокислотный состав, электрофоретическую подвижность, иммунобиологические реакции, соотношения полипептидных цепей, пространственную ориентацию. Чаще всего – это различия в формировании четвертичной структуры. К ферментам, имеющим изоформы, относятся лактатдегидрогеназа, креатинкиназа, малатдегидрогеназа и другие. Соотношения изоформ в разных тканях могут существенно различаться, а также изменяться при патологических состояниях. Эти особенности изоферментов используются в диагностике заболеваний. Изоферменты могут быть определены методами электрофореза, хроматографии и иммунохимическими методами.

Активность ферментов.

Каталитическая активность ферментов зависит от ряда показателей, одним из которых является количество и особенности субстрата. С этими параметрами связана как скорость образования фермент-субстратного комплекса, так и скорость ферментативной реакции. Для нормального протекания реакции необходимо количество субстрата, превышающее константу Михаэлиса-Ментен в 5-10 раз. При большем увеличении количества субстрата скорость ферментативной реакции может падать за счет «субстратного» торможения.

Ферментативная реакция зависит от pH и от температуры среды. Величина pH влияет на процесс связывания фермента с субстратом, на образование и распад фермент-субстратного комплекса. Поэтому для ферментов характерно понятие «оптимума pH». Для большинства ферментов «оптимум pH» – это область физиологических значений pH, характерных для плазмы крови в условиях нормы: 7-8. Однако, есть ферменты оптимум pH для которых лежит в области pH=2 (пепсин, трипсин) и ферменты, активность которых проявляется при достаточно высоких значениях pH, как, например, щелочная фосфатаза, оптимум pH для действия этого фермента – 10,5.

Величина pH очень важна для сохранения активности ферментов, поэтому необходимо использовать подходящие буферные растворы для стабилизации и поддержания постоянного значения pH реакционной среды, необходимого для работы данного фермента. Для большинства ферментов концентрация буферного раствора может варьировать от 0,01 до 0,1 моль/л.

Для нормального протекания ферментативного процесса имеет значение температура, так как от нее зависит скорость ферментативной реакции. При этом необходимо обращать внимание на продолжительность периода инкубации и на стабильность фермента в этих условиях. Чаще всего при анализе ферментов поддерживается температурный оптимум, характерный для нормального состояния человеческого организма 36°C - 37°C . При проведении измерений активности

ферментов необходимо следить за температурой, сохраняя ее постоянство в пределах $\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Ферменты, будучи белками, реагируют на изменения температурного режима – при повышении температуры активность ферментов может увеличиваться. Однако, при достаточно длительном повышении температуры (выше 50°C) активность ферментов снижается, а при дальнейшем повышении температуры может наступить денатурация белка. В настоящее время в справочном материале часто приводят таблицы индивидуальной зависимости активности фермента от изменений температурного режима.

Соединения, присутствие которых приводит к изменению конформации фермента, изменению его активности и состояния активного центра, называют кофакторами. Кофакторы имеют разную степень сродства по отношению к ферментам и центрам активации.

По своей природе кофакторами могут быть ионы металлов: цинка, магния, кальция, меди, марганца, железа, натрия, калия, и биологически активные вещества различного происхождения.

Вещества, способные трансформировать ферменты из неактивного состояния в активное называют активаторами, индукторами, стимуляторами. Активаторы могут изменять структуру и длину молекулы фермента, переводя его из неактивной формы в активную (соляная кислота и пепсин), а также присоединятся к активному центру (катионы и анионы минеральных солей). Активация фермента может быть достигнута воздействием нескольких ионов.

Вещества, приводящие к снижению или подавлению активности ферментов, называются ингибиторами. Ионы металлов в зависимости от концентрации могут выступать как в роли активаторов, так и в роли ингибиторов. Ингибиторы бывают необратимые и обратимые; конкурентные и неконкурентные. Соли тяжелых металлов, реагируя с ферментом, приводят к необратимому ингибированию его активности. Обратимое ингибирование может быть конкурентным и неконкурентным. При конкурентном ингибировании активность фермента может быть восстановлена добавлением избытка субстрата. Обратимое ингибирование ферментов сыворотки часто исчезает при ее разведении, что и является одной из причин повышения активности ферментов сыворотки при ее разведении. Неконкурентное ингибирование может быть вызвано фосфорорганическими соединениями. При определении ферментов в моче, ее необходимо диализовать, так как в моче присутствуют ингибиторы, затрудняющие это определение.

На активность ферментов могут влиять лекарственные препараты и продукты их метаболизма. Это необходимо учитывать при определении ферментативной активности в крови.

Все вышеуказанное имеет значение при анализе ферментативной активности и определяет условия, при которых возможна оценка активности ферментов

Чаще всего присутствие и количество фермента определяется по специфичности и скорости катализируемой им реакции.

Активность фермента (но не его концентрация) определяется косвенно на основании оценки катализируемого процесса, при этом определяется либо убыль субстрата, либо прирост продукта реакции за единицу времени. Фермент может оцениваться на основании количественного определения продуктов катализируемой им реакции. После достижения равновесия ферментативной

реакции – определение проводят по «конечной точке», веществу, появляющемуся в результате реакции. Наиболее удобны реакции, при которых происходит практически полное использование субстрата, его преобразование в метаболит. Методы определения фермента по «конечной точке» мало чувствительны к изменениям условий реакции, особенно, если они незначительны (рН, температура). Пригодность фермента для оценки активности данным методом можно оценить по константе Михаэлиса: чем меньше константа Михаэлиса, тем выше сродство фермента с субстратом и, тем больше фермент пригоден для определения его активности по «конечной точке».

Фермент можно оценить по убыли субстрата в течение определенного промежутка времени протекания ферментативной реакции – метод по «начальной точке» определения фермента.

Метод оценки фермента, связанный с изменением концентрации субстрата в малые фиксированные отрезки времени носит название «кинетический метод». При кинетическом методе определяют изменения в нескольких точках за минуту и проводят расчет по формуле Бугера-Ламберта-Бера.

При данном способе определения активности фермента возможно "двухточечное измерение" когда на исследуемом участке кривой дважды определяют абсорбцию- в начале и в конце измерения.

За единицу активности фермента принимают международную единицу МЕ или Ед, которая представляет количество фермента, катализирующего превращение 1 микромоля (мкмоль или $\mu\text{моль}$) субстрата за 1 минуту. Каталитическая активность выражается числом единиц на 1 литр любой биологической жидкости или 1 мг белка – Ед/л или Ед/мг белка.

В системе СИ единица фермента – это катал (кат) – количество фермента, катализирующее превращение 1 моля субстрата за 1 секунду. Используют также нанокатал (нкат), или микрокатал (мккат). Активность фермента может быть выражена в нкат/л или нкат/мг белка.

$$1 \text{ Ед/л} = 16,67 \text{ нкат/л}$$

$$1 \text{ нкат} = 0,06 \text{ Ед/л}$$

Метаболизм ферментов.

Метаболизм ферментов протекает сходно с аналогичными процессами, характерными для других белков. В плазме происходит их инактивация, и дальнейшие превращения ферменты претерпевают в клетках ретикулоэндотелиальной системы, где при участии тканевых протеаз осуществляется их катаболизм.

Незначительное количество ферментов уходит через пищеварительный тракт, а также через мочевыводящие пути. Последний путь малоэффективен, так как в норме через почечный фильтр могут проходить соединения с молекулярной массой не более 60-70 кДа. Ферменты, находящиеся в желчи, по большей части имеют эндотелиальное происхождение и не связаны с ферментами плазмы.

Ферментология.

Ферментология изучает все процессы, связанные с ферментами, рассматривая их структуру, биологическую активность в норме и при патологии, считая, что патология во многом является результатом последовательных нарушений структуры и функции ферментов.

Ферментология включает в себя несколько направлений анализа ферментов, каждое из которых имеет свою значимость для жизнедеятельности.

Ферменты могут быть использованы в лабораторной практике в качестве высокоочищенных аналитических реагентов для количественного определения метаболитов. Чаще всего они используются в практике клинической лаборатории в виде готовых наборов промышленного производства, которые сопровождаются инструкцией по их применению. Менее специфические ферменты могут быть использованы для тех же целей, но за счет систем, обеспечиваемых сопряженными реакциями, т. е. использования нескольких ферментов, создающих ряд последовательных реакций. Оценка конечного результата проводится разными способами, в том числе и фотометрическими методами. При анализе цельной крови всегда в этих случаях необходима ее депротеинизация, при работе с сывороткой – добавление детергентов.

Ферментопатология.

Изучение нарушений ферментов (количественное и качественное) в патогенезе заболеваний определяет все аспекты ферментопатологии. Одна из основных составляющих жизнедеятельности – согласованная деятельность ферментных систем. При нарушении согласованности возникает болезнь. Нарушение ферментативной активности определяется структурной организацией молекулы фермента, ее сохранности как молекулы в целом, так и составных частей: апофермента и кофермента.

Причинами ферментопатий служат:

1. отсутствие, недостаток, аномальная структура апофермента за счет:
 - повреждение или изменение матрицы ДНК, РНК;
 - недостаток энергообеспечения синтеза;
 - нарушение этапов регуляции синтеза;
 - недостаток пластического материала (аминокислот);
 - повреждение на уровне клеток и клеточных структур.
2. отсутствие, недостаток, аномальная структура коферментов за счет:
 - нарушения поступления витаминов, коферментов;
 - нарушение резорбции витаминов в ЖКТ;
 - нарушение фосфорилирования витаминов в кишечнике;
 - нарушения, приводящие к гиповитаминозу;
 - деструкция клеток.

Ферментопатии могут быть первичными и вторичными. Первичные ферментопатии являются результатом изменений или аномалий, возникающих на генетическом уровне за счет нарушений в структуре ДНК, процессах транскрипции и трансляции, что является причиной молекулярных болезней. Первичные ферментопатии приводят к отсутствию активного фермента в ткани или органе; резкому снижению активности фермента; и в очень редких случаях к повышению его активности.

При отсутствии активного фермента возникают и развиваются наследственные дефекты обмена, при этом происходит накопление неиспользованного субстрата, и в то же время уменьшение продукта реакции, который в свою очередь является субстратом для дальнейших преобразований (следующей реакции) или источником для синтеза биологически активного соединения.

При отсутствии активного фермента или значительного снижения его активности при первичных ферментопатиях могут отмечаться нарушения:

- со стороны субстрата:
 - ❖ накопление не утилизируемого субстрата в клетках, биологических жидкостях;
 - ❖ нарушение обмена субстрата, как метаболита;
 - ❖ накопление аномальных продуктов обмена субстрата;
 - ❖ развитие вторичного метаболического блока;
 - ❖ интоксикация и нарушение функций организма в целом.

Одновременно в случае отсутствия активных форм фермента или значительного снижения его активности возникают нарушения, связанные с продуктом реакции:

- уменьшение содержания продукта реакции;
- нарушение образования биологически активных веществ (метаболитов);
- дефицит биологически активных веществ (метаболитов);
- нарушение регуляции метаболических процессов;
- нарушение функции жизненно важных органов.

Ферментопатии первичного происхождения протекают с различной степенью выраженности.

Если субстрат, который накапливается при ферментопатии, не токсичен, а продукт реакции не используется для синтеза биологически активных веществ и, следовательно, не развивается дефицит биологически активных веществ, то ферментопатия чаще всего протекает бессимптомно.

Бессимптомные ферментопатии характеризуются отсутствием функциональных расстройств, отсутствием клинических проявлений. Они могут быть обнаружены при обследовании как, например, доброкачественная фруктозурия, почечная глюкозурия.

Относительно бессимптомные первичные ферментопатии протекают без субъективных проявлений, но могут обнаруживаться (проявляться) при провокации.

Так, в хирургической практике, обнаруживается скрытый дефицит холинэстеразы при использовании в качестве анестезирующих средств миорелаксантов. Дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы проявляется при назначении противомаларийных препаратов.

Клинические ферментопатии первичного происхождения всегда сопровождаются клиническими проявлениями.

Вторичные ферментопатии возникают и проявляются вследствие повреждения клеток и тканей различными агентами. Воздействие, оказываемое на клетку, клеточную структуру, орган приводит к нарушению активности одного или нескольких ферментов, ферментных систем, что в свою очередь вызывает дисбаланс обменных процессов и возникновение патологии.

Ферментопатии инфекционного происхождения возникают в результате воздействия токсических продуктов обмена вирусов, бактерий, то есть за счет экзо- и эндотоксинов. Аналогично происходит развитие ферментопатий при отравлениях. Яды и продукты их метаболизма вызывают нарушения обменных процессов, деструктивные изменения в клетках и стимулируют дезорганизацию ферментных систем.

Вторичная ферментопатия может возникнуть в результате механического повреждения, вследствие которого нарушается кровоснабжение и следовательно транспорт субстратов и происходит накопление токсических метаболитов.

Ферментодиагностика.

Одним из основных объектов определения ферментативной активности при заболевании служит кровь: сыворотка или плазма. Чаще с диагностическими целями анализируют сыворотку.

В сыворотке крови присутствуют ферменты, имеющие различное происхождение:

- клеточные ферменты – попадают в кровь из тканей в результате физиологического старения и гибели клеток, повышения проницаемости мембран. Уровень этих ферментов в крови зависит от их концентрации в тканях, молекулярной массы и локализации в клетке. Неспецифические клеточные ферменты обнаруживаются в большинстве органов. Органоспецифические ферменты (или маркерные) обнаруживаются в определенных тканях (аргиназа – в паренхиме печени, креатинкиназа – в мышечной ткани).
- Секреторные ферменты выполняют в крови свою специфическую функцию (ферменты свертывающей системы крови и системы фибринолиза постоянно вырабатываются в печени и секретируются в кровь, где и участвуют в процессах гемостаза; аналогично – церулоплазмин из печени поступает в кровь, где осуществляет транспорт меди). Секреторные ферменты специфичны для плазмы.
- Экскреторные ферменты синтезируются пищеварительными железами (поджелудочная железа, слизистая кишечника, эндотелий желчевыводящих путей). Появление этих ферментов в сыворотке в норме обусловлено естественным разрушением клеточных структур. К экскреторным ферментам относится щелочная фосфатаза, амилаза, липаза. Это ферменты неспецифичные для плазмы. В норме их в плазме мало и следовательно активность низка, но она резко увеличивается при патологии органа.

Присутствие ферментов в плазме может быть оценено как: гиперферментопатия, гипоферментопатия и дисферментопатия.

Гипоферментопатия касается большей степени секреторных ферментов и регистрируется редко. Она может быть обусловлена:

1. генетическими нарушениями, приводящими к нарушению синтеза фермента;
2. ингибированием синтеза фермента;
3. усилением деградации фермента.

Гиперферментопатия может быть обусловлена:

1. выходом ферментов из поврежденных органов и тканей;
2. результатом действия сильных раздражителей, сопровождающихся метаболическими перестройками (вместе с появлением лейкоцитоза, увеличением СОЭ);
3. усилением синтеза белка.

Дисферментопатии в основном связаны с появлением в крови органоспецифических ферментов

Диагностически значимые ферменты дают достаточно информации для установления факта развивающейся патологии, оценки тяжести заболевания, контроля проводимой терапии.

Лактатдегидрогеназа (КФ. 1.1.1.27) – ЛДГ.

Лактатдегидрогеназа – ЛДГ (КФ. 1.1.1.27) катализирует окисление лактата в пировиноградную кислоту. Для реакции необходимо присутствие НАД. Фермент присутствует во всех органах и тканях в разных количествах, включая эритроциты.

11

Определяется спектрофотометрически и колориметрически. Имеет диагностическое значение при:

- острый инфаркт миокарда – возрастает активность фермента, достигая максимального значения к 48 часам. При стенокардии увеличение активности фермента в сыворотке не регистрируется;
- паренхиматозный гепатит – регистрируется повышение активности в сыворотке в первую неделю желтушного периода;
- механическая желтуха – активность повышена на поздних стадиях заболевания, вследствие вторичных повреждений печени;
- злокачественные заболевания печени – повышение активности в плазме регистрируется не всегда;

хронический гепатит и цирроз – активность фермента повышена при обострении процесса, а в стадии ремиссии близка к норме. В сыворотке крови постоянно присутствуют 5 изоферментов, которые можно проанализировать (количественно и качественно) после электрофоретического разделения ЛДГ. Изоферментный спектр и преимущественные изменения соотношения изоформ в сыворотке характерны для разных патологий и органов

Ферменты, наиболее часто используемые в диагностике.

фермент	Органы	Патология
Альдолаза	Скелетные мышцы печень	Заболевания мышц
Аланинаминотрансфераза (АлАТ)	Печень, скелетные мышцы, сердце	Паренхиматозные заболевания печени
Амилаза	Слюнные железы, поджелудочная железа	Патология поджелудочной железы
Аспартатаминотрансфераза (АсАТ)	Печень, скелетные мышцы, сердце, почки.	Инфаркт миокарда, паренхиматозные заболевания печени, патология мышц
Гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТ)	Печень, почки	Алкогольная интоксикация Патология гепатобилиарного тракта
Кислая фосфатаз	Простата.	Опухоль простаты

(КФ)		
Креатинкиназа (КК) Креатинфосфокиназа (КФК)	Скелетные мышцы, мозг, сердце, гладкие мышцы	Инфаркт миокарда, заболевания мышц
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)	Сердце, печень, скелетные мышцы, эритроциты, тромбоциты, лимфатические узлы	Инфаркт миокарда, гемолиз, паренхиматозные заболевания печени, острые пневмония, злокачественные новообразования
Липаза	Поджелудочная железа	Патология поджелудочной железы
Щелочная фосфатаза (ЩФ)	Печень, кость, слизистая кишечника.	Патология костной ткани, патология гепатобилиарного тракта

•

Диагностическая значимость изоферментов ЛДГ.

Патология	Изоферменты в крови	Примечания
инфаркт миокарда	ЛДГ ₁ ↑ и частично ЛДГ ₂ ↑	Изменения активности изоферментов в крови сохраняются дольше, чем изменения суммарной активности ЛДГ
гепатит	ЛДГ ₅ ↑ ЛДГ ₄ ↑ ЛДГ ₁ ↓ ЛДГ ₂ ↓	
цирроз печени	ЛДГ ₅ ↑ ЛДГ ₄ ↑	
калькулезный холецистит, обтурационная желтуха опухолевого происхождения	ЛДГ ₅ ↑	
миопатия	ЛДГ ₁ ↑, ЛДГ ₂ ↑, ЛДГ ₃ ↑, ЛДГ ₄ ↓, ЛДГ ₅ ↓	Снижение активности ... соответствует тяжести заболевания
лейкозы	ЛДГ ₂ ↑, ЛДГ ₃ ↑,	В сыворотке крови и в лейкоцитах увеличение активности

		изоферментов параллельно увеличению количества незрелых клеток
опухолевой процесс	ЛДГ ₃ ↑, ЛДГ ₄ ↑, ЛДГ ₅ ↑	Изменения в спектре изоферментов зависят от активности метастазирования
заболевания легких	ЛДГ ₃ ↑	При выраженной гипоксии иногда увеличивается

Аминотрансферазы

Аминотрансферазы принимают участие в переаминировании аминокислот. Диагностически значимы:

- аспаратаминотрансфераза (КФ 2.6.1.1) – АСТ
- аланинаминотрансфераза (КФ 2.6.1.2) – АЛТ

Клеточные ферменты - аминотрансферазы встречаются во всех органах и тканях. Большое количество АСТ содержится в эритроцитах, поэтому для определения активности трансфераз в сыворотке гемолизирующая кровь не используется. Активность ферментов определяется хроматографическими, спектрофотометрическими и колориметрическими методами.

Диагностически значимым при определении активности трансфераз является коэффициент де Ритиса АСТ/АЛТ, изменение которого характерно для патологических процессов.

Глутаматдегидрогеназа (КФ 1.4.1.2) – ГлДГ.

Катализирует превращение глутамата в альфа-кетоглутарат. Фермент локализован в митохондриях и определяется при диагностике заболеваний печени. Отношение активности двух ферментов: сорбитолдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы СДГ/ГлДГ может быть использовано для дифференциальной диагностики желтух. В норме в сыворотке крови фермент практически отсутствует, его активность в сыворотке повышается при повреждении гепатоцитов.

При патологиях, некрозом печеночной ткани, активность ферментов резко увеличивается. Аналогичный эффект вызывает отравление гепатогенными ядами.

Патология	Фермент	Примечания
инфаркт миокарда	АСТ повышение	через 6-12 часов после возникновения инфаркта. Максимум повышения концентрации наблюдается через 24-48 часов. Возвращается к норме через 4-5 дней. Возрастает с увеличением размера очага и некроза
	АЛТ повышение	повышение активности менее резко выражено

стенокардия	АСТ повышение	в пределах нормы за исключением тяжелых приступов
заболевания печени	АЛТ повышение АСТ повышение	первым появляется в крови, активность возрастает при инфекционном гепатите, активность возрастает в инкубационном периоде, максимум увеличения приходится на 6-10 день заболевания. появляется при углублении деструктивных процессов в клетках

Сорбитолдегидрогеназа (КФ 1.1.1.14) – СДГ.

Катализирует превращение сорбитола во фруктозу, обладает органоспецифичностью – содержится в основном в печени, простате, почках. Имеет диагностическое значение при оценке поражения печени. При всех формах острого гепатита в первые 10 дней растет активность этого фермента, поэтому он удобен для ранней диагностики. При хроническом гепатите и циррозе печени увеличение активности фермента характерно для периода обострения заболевания. При механических желтухах – повышение активности фермента регистрируется в первые недели желтушного периода.

γ-Глутамилтранспептидаза (КФ 2.3.2.2) – ГГТП.

γ-Глутамилтранспептидаза катализирует образование новых γ-глутамилпептидов за счет переноса γ-глутамилтранспептидного остатка. Увеличение активности фермента в крови регистрируется при патологии печени разного генеза, наиболее выражено отклонение активности фермента от нормы при циррозе печени алкогольного происхождения.

Активность может также быть увеличена при остром инфаркте миокарда, опухолях головки поджелудочной железы. Активность ферментов в крови таким образом часто определяется сопутствующими заболеваниями.

Превышение нормальных величин активности ГГТП в крови:

Более, чем в 10 раз	В 5-10 раз	Менее, чем в 5 раз
Алкогольное поражение печени Холестаз Рак головки поджелудочной железы	Гепатит Цирроз Заболевания печени Панкреатит	Алкоголизм Отравления Хроническая сердечная недостаточность

Холинэстераза – ХЭ.

Различают два типа ферментов (ХЭ): одна группа – это истинная ХЭ (ацетилхолинэстераза КФ 3.1.1.7), вторая - псевдохолинэстеразы (КФ 3.1.1.8), отличающиеся более широкой субстратной специфичностью.

Повышение активности ХЭ в сыворотке крови наблюдается при тяжелой форме болезни Боткина (на протяжении всего желтушного периода). Увеличение

активности наблюдается также при циррозе печени, при онкологических заболеваниях, в случае метастазирования в печень, нефротическом синдроме, бронхиальной астме, ревматическом эндокардите.

Миорелаксанты могут приводить к длительному выраженному снижению ХЭ.

Ингибирование ХЭ имеет место при отравлении пестицидами, инсектицидами, фосфорорганическими соединениями. При интоксикации угнетение активности ХЭ в сыворотке крови наступает уже при низких дозах яда, и оценивается как один из первых симптомов интоксикации, что и является результатом изменения активности синтеза белков в печени.

Гипоферментемия регистрируется при тяжелых инфекционных заболеваниях, мышечной дистрофии, недостаточности питания.

Креатинкиназа (КФ 2.7.3.2) – КК.

Креатинкиназа – фермент, который присутствует в тканях, нуждающихся в больших количествах энергии в малые промежутки времени. Фермент определяется колориметрически и спектрофотометрически в сыворотке крови. Для определения изоформ может быть использован метод электрофореза или колоночной хроматографии.

Изоферменты КК:

1. ВВ – изофермент мозгового типа, обладает наибольшей подвижностью в электрическом поле;
2. ВМ – изофермент, содержащийся преимущественно в сердечной мышце, обладает наименьшей подвижностью при электрофорезе;
3. ММ – изофермент, характерный для скелетной мускулатуры.

Активность фермента возрастает:

- при повреждении скелетной мускулатуры;
- при прогрессирующей мышечной дистрофии (изоформа ММ)
- при остром инфаркте миокарда (изоформа ВВ), при этом возрастание активности фермента обнаруживается через 3-4 часа после начала заболевания, опережая изменения других ферментов, но не повышается при инфаркте легкого или поражении паренхимы печени, и достигает максимума активности через 18-24 часа;
- при заболеваниях центральной нервной системы, таких как шизофрения, маниакально-депрессивный психоз и других (изоформа ВВ).

На активность фермента могут влиять анестезирующие средства, и изменение активности КК может быть зарегистрировано в послеоперационном периоде.

Щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1) – ЩФ.

Щелочная фосфатаза активна при рН = 8,6-10,1 и сосредоточена в основном в костной ткани, слизистой кишечника, почках, печени.

Активность фермента определяется по используемому субстрату и отщепившемуся в результате реакции неорганическому фосфату или органическому соединению.

Около 10.фосфаты, бораты, оксалаты подавляют активность ферментов

Активность фермента в сыворотке крови у детей выше, чем у взрослых за счет высокой функциональной активности остеобластов. Активность фермента повышается при рахите, остеосаркомах, болезни Педжета, при метастазах опухолей в костную ткань.

Значительное возрастание активности фермента отмечается при патологии гепатобилиарной системы при желтухах различного генеза.

Фермент представлен в сыворотке несколькими изоформами (ИЗФ), что может быть использовано для диагностики заболеваний печени и костной системы:

Наибольшее диагностическое значение имеют

Костная Изф- характеризует патологию костных систем, активность фермента заметно повышена при усиленном росте костей, рахите, гиперпаратиреозе, опухолях костей, переломе. Определение костной ИЗФ наиболее рационально радиоиммунными и изоферментными методами.

Печеночная Изф- представлена двумя изоферментами, активность которых повышается при гепатоцеллюлярном раке печени, при васкулитах, а также в период беременности.

Кишечная Изф- может быть увеличена у лиц 1 и 3 групп крови при патологиях кишечника, сопровождающихся нарушениями всасывания.

Почечная Изф- экскретируется с мочой и также может быть использована в диагностике заболеваний почек

Кислая фосфатаза (КФ 3.11.3.3) – КФ.

Оптимум pH для этого фермента 5,0-5,5. Большое количество КФ содержится в предстательной железе человека. Активность фермента определяет состояние предстательной железы, ее сохранность и повышается при опухолевых процессах.

Диагностическая значимость ферментов

фермент	Повышение активности в сыворотке	Понижение активности в сыворотке	Примечание
Аспартатаминотрансфераза АСТ	Инфаркт миокарда Цирроз печени Мышечная дистрофия Дерматомиозит Опухоли печени	Авитаминоз В6 Почечная недостаточность Беременность Повторный гемодиализ	
Аланиламинотрансфераза АЛТ	Цирроз печени Опухоли печени Метастазы в печени Острый инфекционный гепатит	Авитаминоз В6 Почечная недостаточность Беременность Повторный гемодиализ	

Альфа-амилаза сыворотки	Острый панкреатит Киста поджелудочной железы Закупорка протока поджелудочной железы В случае почечной недостаточности, диабетического ацидоза, воспаления поджелудочной железы на фоне перфорации пептической язвы	Острый и хронический гепатит Недостаточность поджелудочной железы Токсикоз при беременности	
Креатинкиназа (КК)	Инфаркт миокарда Травма мышц Мышечная дистрофия Полимиозит, отравления Гипотиреоз Инсульт		Фермент нестабилен, сыворотку необходимо быстро отделить от сгустка, возможно замораживание
Изофермент КК ММ	Заболевания мышц Дистрофия Гипотиреоз Дерматомиозит. Состояния Рабдомиолиз, Рак, болезни печени. Физическая нагрузка		
Изофермент КК МВ	Инфаркт миокарда Рабдомиолиз Тяжелые поражения мышц Пятнистая лихорадка скалистых гор		
Изофермент	Тяжелый шок,		

т ВВ	роды Некоторые формы рака (легкие, молочная железа, яичники, простата) Заболевания соединительных тканей		
Гамма-глутамилтранспептидаза ГГТП	Алкогольная интоксикация Острый инфекционный, токсический гепатит Хронический или подострый гепатит Патология гепатобилиарной системы Опухоли печени		Высококчувствительный критерий состояния печени
Липаза (сыворотки)	Острый и хронический в стадии обострения панкреатит Закупорка протока поджелудочной железы		Образец может храниться замороженным до суток Повышенная активность сохраняется дольше, чем у амилазы, в моче не обнаруживается
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)	Некроз тканей Гемолитические анемии В12-дефицитная анемия Эритропения Острый инфекционный гепатит (острая фаза) Острые повреждения (?) эритроцитов? , почек, мышц,		Нельзя использовать гемолизированную кровь Определению активности фермента мешает гепарин и оксалат

	печени, легких, кожи		
--	-------------------------	--	--

Кислая фосфатаза (КФ)	Карцинома простаты Болезнь Гоше Злокачественные поражения костей		Нельзя брать кровь в течение 24 часов после массажа простаты или ее инструменталь ного исследования Активность фермента быстро падает Необходимо исключить гемол из
Щелочная фосфатаза (ЩФ)	У детей (нормальный рост костей) Костные заболевания, связанные с увеличением количества остеобластов Гиперпаратиреоз Рахит Остеомаляция Опухоли костей Закупорка желчных протоков Заболевания печени, вызванные лекарствами беременность	Гипотиреоз Замедленный рост у детей	Хранить в холодильнике сыворотку не более 48 часов Нельзя использовать фтористые соединения и оксалат