

## ЗАНЯТИЕ № 4

### **ТЕМА: КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ. ПРИНЦИПЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ. МЕДИЦИНСКАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ (ЭНЗИМОДИАГНОСТИКА, ЭНЗИМОТЕРАПИЯ, ФЕРМЕНТЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ)**

*Цель: Установить основные принципы обнаружения ферментов в биологических объектах (на примере амилазы и уреазы). Ознакомиться с основными свойствами ферментов и кинетикой ферментативных реакций. Дать количественную оценку активности некоторых гидролитических ферментов, имеющих клиническое значение.*

Ферменты обнаруживают и оценивают по двум критериям: по появлению продуктов реакции или по исчезновению субстратов. Ферменты проявляют специфичность в отношении субстратов и типа реакции. Активность ферментов зависит от температуры, рН среды, концентрации субстрата [S] и концентрации фермента [E].

Количественная оценка активности ферментов в биологических жидкостях (кровь, моча, слюна) широко используются в клинической практике для диагностики и дифференциальной диагностики заболеваний. Как правило, активность ферментов увеличивается при заболеваниях печени, инфаркте миокарда и других видах патологии. При диагностике болезней, связанных с врожденной недостаточностью метаболизма, определение активности ферментов становится единственным критерием болезни.

Количественная оценка активности ферментов основывается на измерении количества образовавшегося продукта реакции или убыли субстрата в единицу времени, отнесенного к 1 мг белка или 1 мл биологической жидкости.

В последнее время в клинической практике широко используются ингибиторы трипсина, такие как трасилол, контрикал, гордокс. Эти препараты используются в хирургической практике при острых панкреатитах и панкреонекрозах. Их терапевтическое действие объясняется тем, что при панкреатитах происходит секреция трипсина в активной форме, что вызывает самопереваривание тканей железы. Действие ингибиторов трипсина предотвращает этот процесс.

#### ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

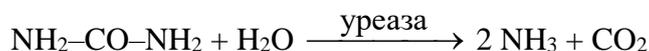
1. Кинетика ферментативных реакций. Зависимость скорости ферментативных реакций от температуры, рН среды, концентраций фермента и субстрата. Уравнение Михаэлиса – Ментен. Константа Михаэлиса, физический смысл.
2. Энзимодиагностика. Органоспецифические ферменты. Изоферменты. Происхождение и физиологическое значение наличия изоферментов. Изоферменты лактатдегидрогеназы, креатинкиназы и др. Принципы определения и медицинское значение изоферментов. Изофункциональные ферменты (рассмотреть на примерах глутатионтрансферазы, карбамоилфосфатсинтетазы).

3. Энзимотерапия. Применение ферментов как лекарственных препаратов для лечения болезней.
4. Принципы качественного и количественного определения ферментов. Единицы измерения активности ферментов.
5. Опыты по изучению влияния рН среды, термолабильности и специфичности ферментов (техника выполнения).
6. Количественное определение диастазы мочи, опыт по ингибированию трипсина. Принцип методов, техника выполнения.

### ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

#### **Опыт № 1: Обнаружение активности уреазы (КФ 3.5.1.5.) и установление ее специфичности.**

Принцип метода. Уреаза катализирует гидролиз мочевины по следующей реакции:



В отличие от мочевины, уреазы не действует на тиомочевину – вещество, структурно сходное  $\text{NH}_2\text{--CS--NH}_2$ .

Техника выполнения.

Реактивы, № пробирки	1	2
1. Вытяжка арбузных семян	1 мл	1 мл
2. 1% раствор мочевины	1 мл	—
3. 1% раствор тиомочевины	—	1 мл
4. Фенолфталеин	2к	2 к

Содержимое обеих пробирок встряхивают, оставляют на несколько минут при комнатной температуре и наблюдают появление розово-малиновой окраски в пробирке с мочевиной (за счет защелачивания среды аммиаком) и отсутствие окраски в пробирке с тиомочевиной. В протоколе:

- Опишите принцип определения уреазы
- Сделайте вывод о виде специфичности уреазы

#### **Опыт № 2: Термолабильность ферментов на примере амилазы слюны.**

Амилаза слюны (К.Ф. 3.2.1.1.) расщепляет гидролитически крахмал по следующей схеме:



Активность амилазы слюны обнаруживают по исчезновению синего окрашивания крахмала при взаимодействии с раствором йода.

Техника выполнения.

Реактивы, мл	№ пробирки	1	2	3
1. 1 % раствор крахмала		0,5 (10к)	0,5	0,5

2. Слюна (разведение 1: 10 ) без кипячения	0,5	–	–
3. Слюна (разведение 1:10 ) после кипячения 2–3 мин.	–	0,5	–
4. Дистиллированная вода (контроль)	–	–	0,5
Инкубируют все пробирки в течение 10 минут			
5. Раствор йода	0,05 (1 К)	0,05	0,05

Запишите свои наблюдения.

**Опыт № 3: Влияние pH на активность амилазы слюны.**

Техника выполнения. В 3 пробирки наливают по 2 мл буферных растворов с различными значениями pH: 1,0; 7,0; 10,0. Затем в каждую пробирку добавляют по 1 мл слюны (разведение 1:10) и по 1 мл 1 % раствора крахмала. Через 10 минут инкубации содержимое всех пробирок проверяют на наличие крахмала реакцией с йодом. Укажите значение pH, при котором произошло полное расщепление крахмала. Нарисуйте график зависимости активности амилазы от pH среды.

**Опыт № 4: Количественное определение диастазы (амилазы) в моче амилокластическим методом (по Каравею) .**

В клинической практике широко применяется количественное определение диастазы (панкреатической амилазы) в моче. Появление этого фермента в моче связано с деструкцией клеток поджелудочной железы при различной патологии и попадании фермента в кровь, а затем через почки в мочу. Уровень диастазы в моче характеризует обширность и глубину поражения поджелудочной железы и, следовательно, тяжесть заболевания. В связи с этим диастаза мочи резко повышается при острых и хронических панкреатитах.

Принцип метода:  $\alpha$ -амилаза гидролизует крахмал с образованием конечных продуктов, не дающих цветной реакции с йодом. При взаимодействии крахмала с йодом образуется окрашенный комплекс, оптическая плотность которого при 640 нм пропорциональна концентрации негидролизованного крахмала. Активность  $\alpha$ -амилазы оценивают по уменьшению интенсивности окраски.

Ход определения. В пробирки вносят реактивы по следующей схеме:

	Контроль (К), мл	Опытная проба (О), мл
Субстратно-буферный раствор	0,5	0,5
Прогреть 5 мин. При 37 °С в водяном термостате; все последующие компоненты вносить в пробы, стоящие в термостате.		
Образец	–	0,1
С момента внесения образца выдержать точно 7,5 мин. При 37 °С.		
Раствор соляной кислоты 0,1 н.	4,0	4,0
Образец	0,1	–
Раствор йода 0,01 н.	0,5	0,5

Определяют оптическую плотность холостой опытной проб при 670 нм (600–700 нм, красный светофильтр), относительно дистиллированной воды в кювете с толщиной слоя 1 см. Окраска стабильна в течении 10 мин. Активность  $\alpha$ -амилазы

выражают в миллиграммах или граммах крахмала, гидролизованного 1 л исследуемого образца за 1 сек инкубации при 37 °С. Расчет производится по формуле:

$$\text{Активность, мг/л·сек} = \frac{A_k - A_o}{A_k} \times 44,4 ,$$

где  $A_k$  – оптическая плотность контрольной пробы;

$A_o$  – оптическая плотность опытной пробы;

Нормальные величины:

В сыворотке (плазме) крови                    3,3–8,9 мг/л·сек;

В моче    до 44 мг/л·сек.

### САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Заполнить таблицу «Применение ферментов в медицине».

Основные разделы	Ферменты. Название	Примеры использования в медицинской практике
Диагностика		
Лечение		
Использование ферментов в качестве аналитических реактивов		

### РЕФЕРАТЫ

- Применение ферментов в диагностике и лечении различных заболеваний.
- Изоферменты. Происхождение, принципы определения и медицинское значение.

### ЛИТЕРАТУРА

- Вилкинсон Д.Ж. Принципы и методы диагностической энзимологии.– Екатеринбург, 1981
- Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. В 2-х тт. Минск, 2000
- Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В. Биохимические исследования в клинике.– Элиста, 1998
- Лабораторные методы исследования в клинике. Под редакцией Мельникова В.В. М., Медицина-1987г.
- Маршалл В.Дж. Клиническая биохимия.– М.–СПб., 1998
- Мосс Д.В., Баттеворт П.Д. Энзимология и медицина.– М., 1978
- Самуилов В.Д. Иммуноферментный анализ. Соросовский образовательный журнал, 1999, № 12, с.9
- Шеховцова Т.Н. Ферменты: их использование в химическом анализе. Соросовский образовательный журнал, 2000, № 1, с.44