**Методы определения активности ферментов**

Ферменты - специфические белки, обладающие каталитической активностью, состоящие из одной или нескольких одинаковых или различных субъединиц. Они имеют высокую молекулярную массу и проявляют каталитическое действие в глобулярной форме.

В состав многих ферментов кроме белковой части, входят и **небелковые компоненты**, которые **называются кофакторами ферментов**. Это могут быть ионы некоторых металлов и неметаллов. Многие ферменты в своем составе содержат небольшие по размерам органические соединения, производные витаминов (NAD+, NADP+, ФАД, ФМН, пиридоксальфосфат и др.). Их обычно называют коферментами.

Кофакторы ферментов участвуют в стабилизации третичной и четвертичной структуры ферментов, обеспечивают связь с субстратами, принимают непосредственное участие в каталитическом процессе, например, в переносе электронов, различных химических групп, СО2 и т.п.

Ферменты являются высокоэффективными катализаторами, способными увеличивать скорость химических реакций в миллионы и миллиарды раз.Кроме того ферменты обладают высокой специфичностью как в отношении химической реакции, которую они катализируют, так в отношении субстратов.

Некоторые ферменты существуют в виде нескольких изоформ (изоферментов). ***Изоферменты*** – это ферменты которые катализируют одну и туже химическую реакцию, но отличаются друг от друга аминокислотным составом, молекулярной массой, сродством к субстратам, электрофоретической подвижностью, иммунологическими и биохимическими характеристиками (могут иметь различный рН-оптимум, по-разному регулироваться). Различные органы и ткани обычно имеют различный набор изоферментов).

Некоторые ферменты из одного источника, катализирующие одну и ту же реакцию, идентичные по своему аминокислотному составу, могут иметь различную конформацию. В таких случаях говорят о *множественных формах фермента.* Например, глутаматдегидрогеназа имеет множественные формы, к ним относятся и комплексные формы ферментов (ассоциации щелочной фосфатазы, гамма-глутамилтрансферазы с липопротеином Х (ЛП-Х).

Фермент, катализируя химическую реакцию, обеспечивает течение реакции с определенной скоростью (V). **V- это скорость, с которой уменьшается конценттрация субстрата или увеличивается концентрация продукта в процессе реакции.** **Иначе говоря, это изменение концентрации субстрата или продукта в единицу времени. Скорость реакции обычно измеряют в мкмоль/ мин и обозначают как МЕ (международная единица).**

На скорость ферментативной реакции влияют многие факторы. К основным можно отнести: концентрации субстрата и фермента, присутствие активатора или ингибитора и их концентрации, рН и температуры среды, природу буферного раствора и его концентрацию.

Одним из наиболее важных факторов, определяющих скорость ферментативной реакции, является концентрация субстрата [S]. При низких концентрациях субстрата (≤ 10% от насыщающей) скорость реакции V прямо пропорциональна концентрации субстрата.

При высоких концентрациях субстрата (насыщающая концентрация), скорость реакции достигает своего максимума Vmax и не зависит от концентрации субстрата. Именно поэтому **активность фермента определяют при насыщающей концентрации субстрата,** которая **численно равна скорости ферментативной реакции в оптимальных условиях на начальном линейном участке кинетической кривой. Концентрация субстрата при этом должна в 5-10 раз превышать константу Михаэлиса-Ментен (Км).**

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

 ***Международная единица активности (МЕ,*** ***U,*** ***Е, Ед)***- это количество фермента, которое катализирует превращение 1 микромоля субстрата или получение 1 мкмоля продукта в минуту в стандартных условиях (мкМоль/ мин).

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

 **1 кат = 6 • 106 МЕ; 1 МЕ = 16,67 • 10 -9 кат.**

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

Иногда используют другие (не международные) единицы активности, особенно в тех случаях, когда субстрат или продукт реакции невозможно выразить в мкмоль/л. Такая ситуация складывается при использовании в качестве субстрата полимерных соединений с неизвестной молекулярной массой. Так, при определении активности α-амилазы методом Каравея в качестве субстрата используют растворимый крахмал, который представляет собой смесь полисахаридов различной молекулярной массы. Поэтому активность фермента выражают в граммах или мг крахмала, гидролизованного одним литром сыворотки крови (мочи) за 1 час , т.е. г/(л•час) или мг/(л•час).

В большинстве случаев **скорость ферментативной реакции прямо пропорцициональна концентрации фермента**,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 она может отличаться в несколько раз.**

**Скорость ферментативной реакции зависит от рН реакционной смеси.** Объясняется это тем, что в активные центры ферментов входят различные ионогенные группы белковых молекул, которые при различных значениях рН среды ионизируются по-разному. ***Значение рН, при котором достигается максимальная скорость катализируемой реакции, называют рН-оптимум фермента.*** Например, рН-оптимум пепсина равен 1,5. а щелочной фосфатазы -9-10. Исходя из этого определение активности того или иного фермента в биологической жидкости необходимо проводить при рН, близкого к рН-оптимуму данного фермента.

**Скорость ферментативной реакции зависит от температуры реакционной** **смеси.** Повышение температуры всего лишь на один градус Цельсия увеличивает скорость ферментативной реакции на 2,5- 20,0%. При более высоких температурах происходит денатурация ферментов и они теряют каталитические свойства. **Поэтому активность ферментов определяют при фиксированной температуре (25, 30, 37оС).**

Существенное влияние на скорость ферментативной реакции оказывает **ионная сила** **раствора**, в котором измеряется активность ферментов. Так как измерение активности ферментов в биологическом материале производят в буферных растворах, их концентрация может колебаться от 0,01 до 0,10 моль/л, что может отражаться на величине измеренной активности ферментов. Более того, состав буферных смесей также оказывает влияние на активность одного и того же фермента.

Из сказанного следует, **что 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 точным выполнением прилагаемой инструкции, также понимание сути происходящих во время анализа процессов.

**Классификация ферментов**

В организме человека, животных, растений, микроорганизмов содержится большое количество ферментов, катализирующих различные по химической сущности реакций. Комиссией по ферментам Международного биохимического союза разработаны классификация и номенклатура ферментов. В основе принятой классификации ферментов лежит специфичность их действия**. *По типу катализируемых*** ***реакций***все ферменты делятся на 6 основных классов (табл.1).

**Таблица 1. Классы ферментов**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Номер класса | Название класса | Катализируемые реакции |
| 123456 | ОксидоредуктазыТрансферазыГидролазыЛиазыИзомеразыЛигазы (синтетазы) |  Окислительно-восстановительныеПеренос группГидролизРасщепление негидролитическим путем связей –С-С-, отщепление групп с образо-ванием двойной связи, присоединение по двойной связи.ИзомеризацииПрисоединение друг к другу двух молекул с использованием энергии АТФ (или других высокоэнергетических соединений). |

Каждый класс ферментов разделяется на подклассы, которые в свою очередь деляться на подподклассы по тому же принципу, т.е. по типу катализируемой реакции. Каждому ферменту в Международной классификации ферментов присваивается четырехзначный код. Первое число кода указывает на принадлежность фермента к одному из шести классов, второе- к подклассу, третье- к подподклассу, и наконец, четвертое число-это порядковый номер фермента в подподклассе. Например, уреаза (систематическое название мочевина: амидогидролаза) имеет шифр 3.5.1.5.

**Механизмы изменений активности ферментов в биологических жидкостях**

Большая часть ферментов локализована внутри клеток. Одни из них находятся в цитозоле (например, ферменты гликолиза), другие в клеточных мембранах (митохондрий, лизосом, эндоплазматической сети и т.п.). В кровоток ферменты поступают из клеток при их повреждении, некрозе, при повышении проницаемости цитоплазматических мембран. **Количество поступающих из поврежденных клеток в кровоток ферментов зависит от количества поврежденных клеток, от содержания ферментов в клетках и прочности связи ферментов с биологическими мембранами.** Во внеклеточной среде,в том числе и в крови, ферменты клеток обычно находятся непродолжительное время. У разных ферментов крови время удаления из кровотока различное, от нескольких минут, до нескольких дней.

 В таблице 2 приведены в качестве примера периоды «полужизни» некоторых ферментов в плазме крови.

Таблица 2. **Периоды «полужизни» некоторых ферментов в плазме крови**

|  |  |
| --- | --- |
| Название фермента | Период «полужизни» |
| АспартатаминотрансферазаАланинаминотрансферазаКреатинкиназа Щелочная фосфатазаАмилазаЛДГ-1ЛДГ-11 | 17±5 час47±10 час15 час3-7 дней10 дней113±час10±2 час |

***Каким превращениям подвергаются находящиеся в крови ферменты?*** Внеклеточная среда для клеточных ферментов является чужеродной средой, с иным электролитным, биохимическим составом, с отличными от клеток физико-химическими параметрами, поэтому под действием различных факторов внеклеточной жидкости белковые молекулы ферментов в крови подвергаются различным конформационным и химическим превращениям. В частности, поскольку любое повреждение клеток (тканей) вызывает воспалительную реакцию организма, молекулы ферментов крови подвергаются т.н. **физиологической денатурации**, при которой они становятся эндогенными патогенами (флогогенами, от греч. флогос- воспаление), Флогогены фагоцитируются моноцитами и макрофагами исчезая, из кровотока. Лишь низкомолекулярные ферменты, такие как альфа-амилаза поджелудочной железы, способны проникать через почечный фильтр и выводится из организма с мочой. Все остальные ферменты, имеющие достаточно большие молекулярные массы, не способны удалятся из кровотока путем экскреции почками. **Удаление (элиминация) таких патогенов (повторим, что во внеклеточной среде клеточные ферменты являются чужеродными веществами, флогогенами) происходит главным образом в процессе воспалительной реакции путем фагоцитоза моноцитами, нейтрофилами и макрофагами**. Все эти процессы очищения крови от чужеродных веществ (физиологически денатурированных эндогенных патогенов) осуществляется в основном путем фагоцитоза.

Так как различные ферменты клеток поступают в кровь при повреждениях клеток и с различной скоростью удаляются из кровотока, кинетика активности различных ферментов крови используется не только для диагностики повреждения тех или иных органов и тканей, но и является свидетельством степени повреждения тех или иных тканей и органов и состояния механизмов очищения крови от клеточных ферментов.

**Методы определения активности ферментов**

Отличительными особенностями ферментов как аналитов являются:

- их очень низкое содержание в клетках и биологических жидкостях;

- небольшое время их существования в биоматериалах (быстрая обновляе-

мость, быстрое уменьшение их каталитической активности при нарушениях синтеза и элиминации);

- высокая каталитическая активность нативных ферментов в оптимальных условиях;

- нестабильность in vitro;

- большой диапазон содержания (активности) при патологических состояниях;

- различная диагностическая специфичность различных ферментов внеклеточной жидкости.

В противоположность большинству других биохимических компонентов биологических жидкостей количество ферментов (в молях или мг) не может быть измерено, за небольшим исключением. Объясняется это тем, что количество молекул фермента в исследуемом материале крайне мало и существующими биохимическими методами такие количества измерить не удается. **О количестве фермента косвенно судят по его активности, то есть по производимому ферментом действию.** Иными словами, присутствие и количество ферментов в исследуемом материале распознается по их специфичности и скорости катализируемой ими реакции.

 Любое изменение конформации ферментов, наличие ингибиторов или отсутствие активаторов приводит к изменению их каталитической активности. Присутствие в биожидкостях факторов, воздействующих на конформацию ферментов, изменяет их активность. К таким факторам, в частности, относится низкая аналитическая концентрация ферментов во внеклеточном пространстве; разбавление концентрации внутриклеточных ферментов в большом объёме ВКЖ может приводить к необратимым денатурационным изменениям и частичный или полной потере каталитической активности.

**Активность фермента можно определить либо по скорости накопления продуктов ферментативной реакции, либо по скорости убыли субстрата.**

Рекомендуется активность ферментов по возможности определять по начальной скорости реакции. В это время ещё имеется избыток субстрата, продуктов реакции образовалось ещё мало и фермент не успел частично разрушиться. Желательно определение активности ферментов производить в таких условиях, когда количество превращенного (израсходованного) субстрата не превышает 20% от исходного уровня.

При исследовании ферментов,требующих для своего каталитического действия присутствия кофакторов, а также ионов металлов, последние должны быть добавлены в инкубационную смесь.

Для определения активности ферментов можно применять **колориметрические, спектрофотометрические, флуориметрические, кондуктометрические и другие физико-химические методы**. В практике работы клинико-диагностических лабораторий для определения активности ферментов чаще используют фотометрические и спектрофотометрические методы.

 **В основе фотометрических методов** лежит измерение при помощи колориметров,фотометров интенсивности окраски веществ,образующихся при взаимодействии субстрата или продукта реакции со специфическими реагентами, добавленными в пробу, как правило, после остановки ферментативной реакции.

 **Спектрофотометрические методы** основаны на поглощении света определенных участков спектра субстратами или продуктами реакции. Спектры поглощения этих соединений могут иметь максимумы при определенной длине волны как в ультрафиолетовой, так и в видимой области.

Спектрофотометрические методы широко применяются для определения активности оксидоредуктаз, в частности, дегидрогеназ, которые действуют с участием NAD+ или NADP. Переход NAD+ в NADH (NADP+ в NADPH) сопровождается изменением поглощения длины волны 340 нм; окисленная форма кофактора не поглощает эту длину волны, а восстановленная поглощает. Определение активности ферментов, основанное на разнице спектров поглощения окисленной и восстановленной форм никотинамидадениндинуклеотидных коферментов, получило название оптического теста Отто Варбурга.

Методики, в основе которых лежит тест Варбурга, могут быть использованы для определения активности не только дегидрогеназ, но и других ферментов. В этих случаях в инкубационную смесь вносят вспомогательные субстраты, ферменты и коферменты, среди которых содержатся либо окисленные NAD+ (NADP+), либо восстановленные их формы (NADH, NADPH).

Рассмотрим некоторые абсорбционные методы определения активности ферментов.

Как отмечалось выше, **активность фермента численно равна скорости ферментативной реакции в оптимальных условиях на начальном линейном участке кинетической кривой при насыщающей концентрации субстрата**. Скорость ферментативной реакции можно определять по изменению концентрации субстрата или продукта в реакционной смеси.

В настоящее время в КДЛ **основными абсорбционными (спектрофотометрическими) методами определения активности ферментов являются следующие:**

***Аланинаминотрансфераза (АлАТ, АЛТ) и***

***аспартатаминотрансфераза (АсАТ)***

**Аминотрансферазы** катализируют реакции переноса аминогруппы с аминокислот на α- кетокислоты с образованием новых аминокислот и новых кетокислот.

Эти реакции играют большую биологическую роль, так как обеспечивают биосинтез необходимых организму аминокислот.

Аминотрансферазы содержатся во всех клетках организма, но относительное содержание их в клетках разных органов и тканей не одинаково. Так, гепатоциты содержат больше аланинаминотрансферазу, а кардиомиоциты- аспартатаминотранс-феразу. В клетках эти два типа трансаминаз распределены между клеточными структурами неравномерно: аланинаминотрансфераза в основном локализована в цитозоле, а АсАТ находится и в цитозоле, и в митохондриях.

Для проявления высокой каталитической активности трансаминаз необходимым условием является содержание в них кофактора - производного витамина В6 - фосфопиридоксаля, который непосредственно участвует в химическом превращении аминокислот. При дефиците фосфопиридоксаля, несмотря на достаточное количество апофермента, каталитическая активность трансаминаз практически равна нулю.

Среди нескольких унифицированных методов измерения активности АлАТ и АсАТ в крови наиболее часто используются:

***Колориметрический метод определения активности АлАТ Райтмана-Френкеля****.*

Этот метод определения активности аминотрансфераз **по конечной точке** основан на следующей химической реакции;

 *L-аланин +α-кетоглутарат* ***АлАТ***  *Пируват + L-глутамат*

*Пируват +2,4-динитрофенилгидразин +ОН¯ Продукт коричневого цвета*

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

***Кинетический УФ метод определения активности АлАТ***

Химизм реакций:

*L-аланин +α-кетоглутарат Ал****АТ*** *пируват + глутамат*

*Пируват + NADH +H+*  ***ЛДГ*** *Лактат + NAD+*

Метод основан на измерении оптической плотности восстановленного NADH в процессе его окисления пируватом с образованием NAD+. Восстановленный NADH имеет максимум поглощения длины волны 340нм, в то время как его окисленная форма, образующаяся в результате реакции, эту длину волны не поглощает.

Оптическая плотность реакционной смеси пропорциональна концентрации либо продукта реакции, либо кофермента. Таким образом, чтобы измерить скорость ферментативной реакции, надо определить изменение оптической плотности в единицу времени (в минуту).

Скорость окисления NADH пропорциональна активности АлАТ.

***Определение активности аспартатаминотрансферазы (АсАТ )***

 ***по конечной точке методом Райтмана-Френкеля***

**Принцип метода-** тот же, что и при определении активности АлАТ

Химизм реакций:

 *L-аспартат + α-кетоглутарат* ***АсАТ О****ксалоацетат+ L-глутамат*

 *Оксалоацетат +2,4-ДНФГ Динитрофенилгидразон*

Продукт реакции динитрофенилгидразон имеет коричневую окраску, интенсивность которой измеряют колориметрически после остановки реакции добавлением щелочи при длине волны 500-560 нм.

Активность фермента прямо пропорциональна оптической плотности продукта реакции.

***Определение активности аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови кинетическим ультрафиолетовым методом (тест Варбурга)***

**Принцип метода:** тот же, что и для АлАТ.

Химизм реакций:

А) основная реакция:

*L-аспартат +α-кетоглутарат* ***АсАТ*** *Оксалоацетат + L-глутамат.*

Б) индикаторная реакция:

*Оксалоацетат + NADH +H+* *МДГ L-малат + NAD+*(МДГ- малатдегидрогеназа)

**Ход измерения:**

После внесения в термостатируемую кювету необходимых реагентов через 60 сек измеряют экстинкцию. Ровно через 1 и 2 мин измеряют экстинкцию А1, А2  против воды при 340 нм.

 Одновременно проводят измерение активности калибровочного раствора,содержащего известную активность фермента.

Расчет производят по формуле:

 Активность АсАТ = (А2 –А1) пробы / (А2 –А1) кал х акт. стандарта

Есть и другие способы расчета активности ферментов.

***Щелочная фосфатаза (ЩФ)***

Фосфатазы-ферменты класса гидролаз, катализируют реакции гидролитического отщепления от сложных эфиров органических соединений остатки ортофосфорной кислоты.В зависимости от реакции среды, в которой ферменты наиболее активны, все фосфатазы делятся на кислые и щелочные фосфатазы.

**Щелочная фосфатаза**- гетерогенный фермент,представленный отдельными изоферментами, каждый из которых сосредоточен в определенном органе. Различают печеночный, костный, кишечный, плацентарный, холестатический, почечный изофермент щелочной фосфатазы. Для всех этих ферментов рН-оптимум находится в щелочной среде. В крови взрослых здоровых людей обнаруживается лишь печеночная форма фосфатазы. У детей сыворотка крови содержит также в большом количестве костную ЩФ.

**Принцип метода.** ЩФ расщепляет в глициновом буфере 4-нитрофенилфосфат с образованием фосфата и окрашенного в щелочной среде в желтый цвет 4-нитрофенола.

**Ход определения.** Пробу крови вносят в буферный раствор, далее в него добавляют субстрат, инкубируют 10 мин, останавливают реакцию раствором ЭДТА, перемешивают и измеряют экстинкцию пробы и контрольного раствора против воды и вычисляют разность экстинкций опытной и контрольной проб и рассчитывают активность фермента по формуле. (При определении экстинкции при различных длинах волн в формулах используются соответствующие коэффициенты).

Одним из часто определяемых ферментов в крови является **креатинфосфокиназа** или сокращенно **креатинкиназа (КК).** Этот фермент относится к классу трансфераз, подклассу фосфотрансфераз.

Креатинкиназа катализирует обратимое фосфорилирование креатина с участием АДФ. Наибольшее количество креатинкиназы содержится в скелетной мускулатуре,сердце и головном мозге. Креатинфосфокиназа (КФК или КК) - димер, состоящий из двух субъединиц – М (muscle) и В (brain). Из них образуются три изофермента:

КК-ММ (мышечный),

КК-МВ (сердечный),

КК-ВВ (мозговой).

Все изоферменты катализируют обратимую реакцию:

***Креатинфосфат +АДФ Креатин + АТФ***

***Определение активности общей креатинкиназы в сыворотке крови***

В настоящее время в основном используется методы, основанные на оптическом тесте Варбурга по реакции, приведенной выше, в сопряжении с другими ферментными реакциями.

***Принцип метода:***

Креатинкиназа катализирует фосфорилирование АДФ в присутствии креатинфосфата,образуя АТФ и креатин (см. реакцию выше). Активность фермента определяется по скорости образования NADPH, оптическую плотность которого измеряют при 340 нм, в ряде реакций с участием гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ).

*АТФ +Глюкоза*  ***Гексокиназа*** *АДФ + Глюкозо-6-фосфат*

*Глюкозо-6-фосфат + NADP+* ***Г-6-ФДГ NADPH*** *+6-фосфоглюконат*

 Повышение экстинкции при 340 нм, обусловленное образованием восстановленного кофермента, пропорционально активности фермента.

***Референтные интервалы***: муж -52-200 МЕ/л

 жен -35-165 МЕ/л

Креатинкиназа играет важную роль в мышцах, обеспечивая превращение АДФ в АТФ при сокращении мускулатуры, используя креатинфосфат как резервную форму макроэргических фосфатных соединений.

Сывороточная креатинкиназа в основном имеет мышечное происхождение и её активность зависит от ряда физиологических факторов (пола, возраста, мышечной массы, физической активности, расы).

Активность креатинкиназы значительно увеличивается при заболеваниях скелетной мускулатуры (мышечная дистрофия, миозиты, полимиозиты, злокачественная гипертермия, травмы, острый рабдомиолиз), центральной нервной системы (острые цереброваскулярные заболевания, церебральная ишемия, синдром Рейё) и щитовидной железы (гипотиреоз)

После инфаркта миокарда подъём активности фермента наблюдается через 3-6 часов и достигает своего максимума через 24-36 часов. Фермент быстро выводится из организма, так что его активность возвращается к исходному уровню через 3-4 дня.

***Определение общей активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови***

ЛДГ- гликолитический фермент, катализирующий обратимую реакцию восстановления пирувата в лактат и дегидрирование лактата с образованием пирувата. В качестве кофактора содержит NAD+ (NADH). Фермент содержится в клетках всех органов и тканей, но наиболее высока его активность в почках, сердце, скелетной мускулатуре, печени и эритроцитах.

***Кинетический метод определения активности общей ЛДГ***

***Принцип метода:*** фермент катализирует восстановление пирувата восстановленным NADH + H+ с образованием лактата и окисленного NAD+.

Скорость реакции определяется путем измерения экстинкции при длине волны 340 нм; снижение оптической плотности в единицу времени пропорционально активности ЛДГ.

 ***Химизм реакции:***

 ***Пируват + NADH+H+ ЛДГ Лактат +NAD+***

**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, р-нитрофенол, поэтому этот подход используют при определении активности фосфатаз. Кислая и щелочная фосфатазы гидролизуют пара-нитрофенолфосфат с образованием пара-нитрофенола, который в щелочной среде окрашивается в желтый цвет, интенсивность окраски измеряют при 405нм.

2.***Окрашивание продукта или субстрата красителем.*** Если продукт ферментативной реакции или субстрат не имеет окраски, их превращают в окрашенные производные. В методе Райтмана-Френкеля для определения активности трансаминаз продукт реакции пируват переводят в окрашенную форму взаимодействием с 2,4-динитрофенилгидразином.

**3*.Тест Варбурга.*** В некоторых методах измерения активности ферментов используются сопряженные ферментативные реакции с участием NADH или NADPH, которые имеют максимум поглощения при 340 нм, в то время как их окисленные формы (NAD+ или NADP+), при этой длине волны не поглощают.

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

**Способы измерения скорости ферментативной реакции**

Определение активности ферментов биологических материалов осуществляют при помощи нескольких способов определения скорости ферментативной реакции.

***1.Измерение «по конечной точке».***

 Способ заключается в измерении оптической плотности на линейном участке кинетической кривой по истечении определенного четко фиксированного отрезка времени t от начала реакции. Такой способ называют ещё одноточечной кинетикой. Как правило, по истечении указанного отрезка времени t в реакционную смесь вносят реагент, останавливающий ферментативную реакцию, например, кислоту или щелочь. Отсюда и название способа –«по конечной точке».

Скорость изменения оптической плотности рассчитывают по формуле:

 **∆А /мин =(Аоп –Ахол) /t,**

где Ахол- оптическая плотность холостой пробы на реагент или сыворотку, если они вносят значительный вклад в окраску реакционной смеси.

***2.Измерение двухточечное.***

 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

 **∆А/мин = (А2 – А1) /t**

Этот способ используют в современных методах определения активности многих ферментов.

***3.Измерение многоточечное, или кинетическое.***

При этом способе оптическую плотность на линейном участке кинетической кривой определяют -3-5 раз через четко фиксированные интервалы времени. Скорость изменения оптической плотности рассчитывают по формуле:

 **∆А/мин = ∆Ᾱ /t**

Многоточечная кинетика используется только для биохимических анализа-

торов, так как в ручном варианте это достаточно трудоемко. Двух- и многоточечный варианты особенно эффективны при определении активности аллостерических ферментов. Многоточечная кинетика считается наиболее точным способом измерения скорости ферментативной реакции.

**Расчет ферментативной активности**

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

***1.Расчет по калибратору*** (стандарту) проводят при наличии в наборе реагентов раствора продукта реакции, или субстрата с известной концентрацией. При этом на всей области определения активности фермента оптическая плотность реакционной смеси должна линейно зависеть от концентрации калибратора, т.е. подчиняться закону Бугера-Ламберта-Бера.

***2.Расчет по калибровочной кривой*** проводят, если оптическая плотность реакционной смеси ***нелинейно*** зависит от концентрации продукта реакции. Это может происходить по ряду причин: поток световой энергии не является монохроматическим, что имеет место, когда используются интерференционные или стеклянные светофильтры, т.е. зависит от средства 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 экстинкции реакционной смеси от концентрации продукта реакции в процессе анализа одновременно с опытными пробами инкубируют не менее 4-х стандартных (калибровочных) проб, содержащих продукт в различных, но известных концентрациях. По полученным данным строят калибровочный график в координатах {X=Е}, {Y= ∆A/ мин }, (илиY= ∆A/ за время реакции, ∆А =Аоп-Ахол) и по нему находят активность в опытной пробе.

**Ферментные методы определения субстратов**

В современной клинической биохимии ферментативные методы анализа постепенно вытесняют химические методы. Они отличаются от химических методов определения различных аналитов в биоматериалах высокой специфичностью, низкой температурой реакций, обладают высокой аналитической чувствительностью, проводятся в водных растворах. Аналит во всех этих методах выступает в качестве субстрата.

В настоящее время в КДЛ ферментативными методами определяют глюкозу, креатинин, мочевину, мочевую кислоту, холестерин, триацилглицерины, лактат, и многие другие аналиты. В качестве примера приведем схемы реакций и принципы некоторых методов.

***Уреазный салицилат-гипохлоритный, уреазный фенол-гипохлоритный метод определения мочевины***

**Мочевина** + Н2О ***Уреаза***  2 **NH3 + CO**2

NH3 + cалицилат натрия + гипохлорит натрия +нитропруссид Na продукт зеленого цвета

Интенсивность окраски продукта реакции пропорциональна концентрации мочевины. В фенолгипохлоритном методе место салицилата натрия (точнее, 4-хлорсалицилата натрия) используют фенол и получают продукт голубого цвета (фенолиндофеноловый синий).

***Уреазный глутаматдегидрогеназный метод***

 **Мочевина** **+ Н2О *Уреаза*  2NH3 + CO2**

**NH3 +α-кетоглутарат + NADH +H+ *Глутаматдегидрогеназа*  Глутамат +NAD+ + Н2О**

Скорость окисления NADH пропорциональна концентрации мочевины.

***Глюкозооксидазный-пероксидазный метод определения глюкозы***

**Глюкоза + О2 *Глюкозооксидаза* Н2О2 + Гюконовая кислота**

**Н2О2 + фенол +4-аминоантипирин *Пероксидаза* Хинониминовый краситель**

Концентрация продукта реакции пропорциональна концентрации глюкозы в пробе, так как скорость его образования пропорциональна концентрации образованного при окислении глюкозы пероксида водорода.

 ***Гексокиназный метод определения глюкозы***

**Глюкоза** +**АТФ  *Гексокиназа*  Глюкозо-6-фосфат (Г-6-Р) + АДФ**

  **Г-6-Р +NADР+ *Г-6-Р дегидрогеназа* 6-фосфоглюконат +NADPH**

Количество образовавшегося в результате сопряженных реакций NADPH пропорционально концентрации глюкозы в пробе.

***Креатининиминогидролазно- глутаматдегидрогеназный метод определения креатинина***

**Креатинин + Н2О *Креатининиминогидролаза* N-метилгидантоин + NH3**

**NH3 + NADH +α-кетоглутарат *Глутаматдегидрогеназа* Глутамат +NAD+**

Скорость окисления NADH пропорциональна концентрации креатинина.

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

В первом случае фотометрирование осуществляют на начальном линейном участке кинетической кривой, при этом скорость изменения оптической плотности реакционной смеси прямо пропорциональна концентрации аналита; во втором- когда кинетическая кривая выходит на плато, при этом оптическая плотность реакционной смеси прямо пропорциональна концентрации аналита.

**Таким образом, все используемые методы можно объединить в 4 группы:**

 **-колориметрические по конечной точке,**

 **-колориметрические кинетические,**

**-УФ методы по конечной точке и**

 **-кинетические УФ методы.**

Сущность колориметрических методов по конечной точке 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; интенсивность его окраски пропорциональна концентрации аналита в биологической жидкости.

Расчет концентрации аналита проводят относительно концентрации калибратотора (стандарта) по формуле:

 **С = [(Аоп –А хол) : ( Акал –А хол)] х Скал**

где С-концентрация аналита;

 Аоп  -оптическая плотность опытной пробы;

 Ахол –оптическая плотность холостой пробы (бланка);

 Акал- оптическая плотность калибратора;

 Скал –концентрация аналита калибратора.

Необходимо отметить, что все реакции как первого, так и второго этапов должны во время инкубации обеспечить 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 инструкциях к используемому набору реагентов (рН, температуру, время реакции и т.д.).

**Колориметрические кинетические методы**

К этой группе можно отнести методы, аналогичные методам по конечной точке, только 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 (многоточечная кинетика) измерений оптической плотности через четко фиксированные интервалы времени. Изменения оптической плотности рассчитывают по формуле:

 **∆А/мин =А2 – А/t** (для двухточечной кинетике).

Расчет концентрации аналита проводят относительно калибратора.Все измерения оптической плотности должны производиться точно на линейном участке кинетической кривой.

**УФ методы по конечной точке**

Примером применения такого метода измерения является определение глюкозы в крови гексокиназным методом. Его сущность заключается в том, что на последнем этапе цепи ферментативных превращений глюкозы участвует глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, при действии которой NADP+ восстанавливается в NADPH. Концентрацию NADPH определяют фотометрически при длине волны 340 нм (УФ метод). Она пропорциональна концентрации в крови глюкозы. Расчет проводят относительно калибровочного раствора глюкозы. В этом методе все ферментативные реакции должны обеспечить полное превращение субстратов в продукты и NADP+ в NADPH, т.е. кинетические кривые должны выйти на плато за время инкубации.

**УФ кинетические методы**

В этих методах на первом этапе происходит ферментативное превращение соответствующего аналита собразованием продуктов, которые в последнем этапе ферментативных реакций окисляют NADH в NAD+ или NADPH в NADP+ как в случае мочевины или креатинина (см. описание реакций выше). Скорость окисления восстановленных никотинамидадениндинуклеотидных коферментов пропорциональна концентрации аналита. Для определения скорости реакции проводят два или несколько измерений оптической плотности при 340 нм через четко фиксированные отрезки времени на линейном участке кинетической кривой. Таким образом определяют изменение оптической плотности в минуту и рассчитывают концентрацию аналита относительно калибровочного раствора определяемого аналита.

**Основные правила работы с ферментами**

Работа с ферментами требует соблюдения простых правил, вытекающих из общих для всех ферментов свойств.

1.Нельзя сильно встряхивать растворы ферментов и допускать образования 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 следует выдержать при комнатной температуре в течение времени, указанного в инструкции, чтобы фермент приобрел 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 неверными. Началом реакции считается момент добавления сыворотки (или стартера) в реакционную смесь, а также окрашивающего реагента, если реакция двухстадийная.

4.Перед началом ферментативной реакции температуру рабочего реагента необходимо довести до значения, указанного в инструкции, и обеспечивать его поддержание в течение всего времени анализа с точностью ±0,10С. В случае ферментативных методов анализа желательно, а при определении активности ферментов обязательно использовать водяную баню (водяной термостат). Так как теплопроводность воды значительно выше теплопроводности воздуха, водяной термостат быстрей и надежнее обеспечивает установку и поддержание заданной температуры реакционной смеси.

5.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 аналита 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.) отклоняется 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 превышает верхнюю границу линейности набора, то исследуемую пробу необходимо разбавить строго в соответствии с рекомендациями, изложенными в инструкции к набору (чем разбавлять в 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, АлАТ и АсАТ) непропорционально уменьшается при разбавлении. В необходимых случаях надо стремиться разбавлять пробу минимально, желательно, в 2-3 раза (особенно при определении активности ферментов) и не больше, чем указано в инструкции. 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 длиной оптического пути в 1 см при данной длине волны, то для другой длины волны значение его будет иным и может значительно отличаться.**

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

10. Калибровочную пробу необходимо ставить для каждой серии анализов в 4-х параллелях.

11.Следует тщательно мыть посуду, пипетки, наконечники и многократно ополаскивать их дистиллированной водой. Для мытья посуды нельзя использовать моющие средства, содержащие биодобавки; содержащиеся в них протеазы даже в следовых количествах могут разрушать ферменты в реакционной среде. Особенно тщательно нужно отмывать перекись водорода, используемую для обеззараживания пробирок и наконечников.

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

13. При работе с ферментными наборами реагентов желательно, а при дозировании малых объёмов проб, реагентов (10-30 мкл) обязательно следует пользоваться поверенными автоматическими микродозаторами. Наконечники для них повторно лучше не использовать, особенно те, которыми проводили отбор сыворотки и затем обеззараживали перекисью водорода.

14. Для получения достоверных результатов очень важен преаналитический этап. Рекомендуется как можно быстрей отделять сыворотку от сгустка (гемолиз, например, завышает результаты определения ЛДГ, АлАТ). Хранение сыворотки также неблагоприятно сказывается на результатах определения активности многих ферментов (они, обычно, занижаются), поэтому следует измерять активность ферментов в сыворотке в день взятия крови у пациента.

**Соблюдение этих и некоторых других правил работы гарантирует высокую точность и воспроизводимость результатов анализа.**