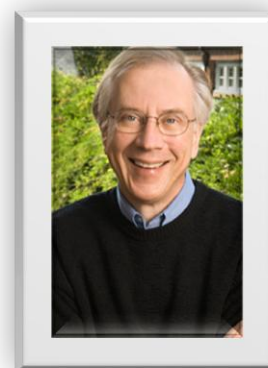


Kapitola 15 Enzymy

Enzymy jsou biologické katalyzátory (bio)chemických reakcí. V převážné většině jsou to bílkoviny. Donedávna se předpokládalo, že jsou to *výlučně* bílkoviny, katalytická aktivita byla ale zjištěna též u jisté RNA (americkým vědcem zajímavého jména - Thomas Cech). Zdá se, že nukleové kyseliny byly prvními biokatalyzátory a teprve po nich tuto funkci převzaly enzymy.

Enzymy jsou buď čistě bílkovinné povahy (kromě uvedené výjimky) nebo obsahují ještě nízkomolekulární skupinu, která může být pevně navázaná na bílkovinný nosič (apoenzym), pak se nazývá *prostetická skupina*, nebo je disociabilní, pak se nazývá *koenzym* (nebo též *kosubstrát*).

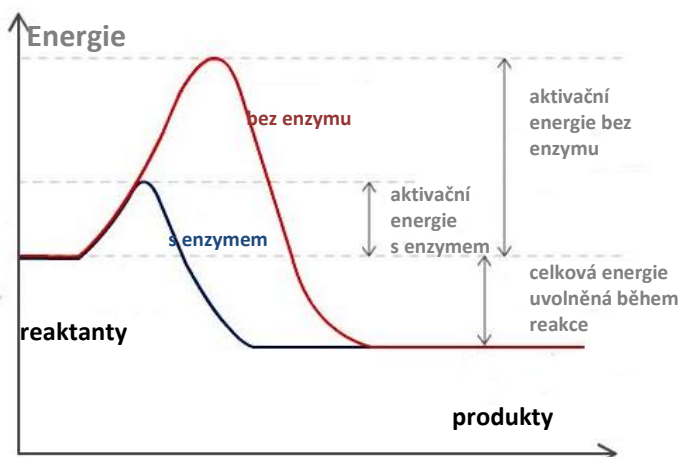
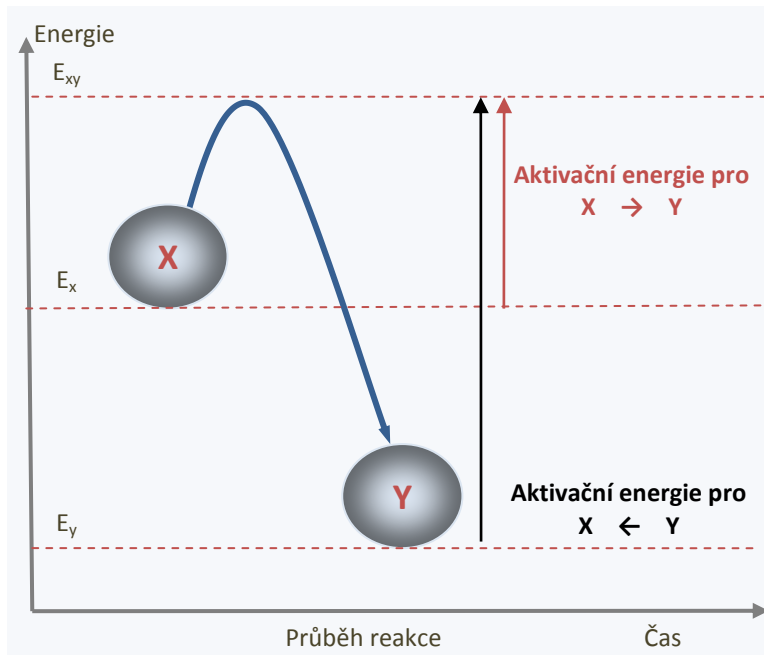
Jak uvidíme dále, jsou v laboratorní medicíně enzymy jednak předmětem vlastní analýzy, slouží jako indikátory patologických procesů, jednak se užívají jako specifická činidla pro stanovení mnoha dalších analytů. Nebude proto na škodu zopakovat si některé skutečnosti známé z obecné biochemie.



Thomas Robert Cech
Nobelova cena za chemii
v roce 1989 (spolu se
Sidneym Altmanem) za objev
katalytické aktivity RNA

15.1. Enzymy jsou biologické katalyzátory

Konstatování, že enzymy jsou biochemické katalyzátory znamená, že usnadňují a urychlují průběh biochemických reakcí, tj. chemických reakcí probíhajících v živých organismech. Způsob účinku enzymů spočívá v tom, že snižují tzv. *aktivační energii* nutnou pro zahájení reakce. Následující obrázek uvedené ve zjednodušené formě ilustruje.



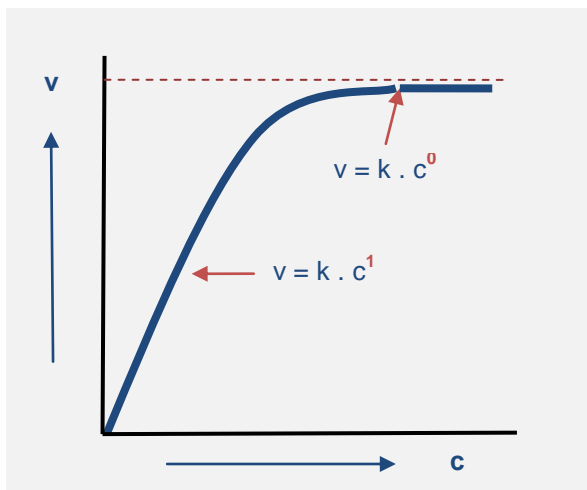
Stejný příběh jako na horním obrázku, ale jsou zaznamenány průběhy reakce nekatalyzované (červeně) a katalyzované (modře).

Rychlostí chemické reakce se rozumí přeměna výchozích látek/substrátu na produkt za časovou jednotku a většinou se měří jako změna koncentrace výchozích látek/substrátů nebo tvořících se látek/produktů za časovou jednotku. Kromě jiného závisí rychlost chemické reakce na koncentraci reagujících molekul. V případě enzymově katalyzovaných reakcí bude rychlost reakce ovlivněna i koncentrací enzymu.

Představme si pokus, kdy v řadě zkumavek budeme mít stejné reakční prostředí (stejný pufr, stejné množství enzymu, stejné aktivátory ap.), ale v každé následující zkumavce bude postupně vyšší a vyšší koncentrace reagentu S. Uvažujeme reakci, kdy se látka S mění na látku P.

Budeme měřit tvorbu produktu (např. měřením absorbance tvořící se barevné látky P) za časovou jednotku. Hodnoty rychlosti „v“ chemické reakce vyneseme proti koncentracím „c“ látky S do grafu. Graf bude mít nejspíš obdobný průběh, jaký je uveden na obrázku:

Graf závislosti reakční rychlosti na koncentraci reagentu/substrátu (saturační křivka enzymu)



Graf názorně ukazuje, že se vzrůstající koncentrací substrátu (látky S vstupující do reakce a měnící se na produkt P) reakční rychlost narůstá přímo úměrně této vzrůstající koncentraci, pak se nárůst rychlosti zpomaluje a nakonec zůstává rychlost konstantní bez ohledu na hodnotu koncentrace substrátu. Vysvětlení k rovnicím uvedeným v grafu je dále v textu.

c = koncentrace substrátu S

v = rychlost reakce

Zpočátku, se zvyšující se koncentrací substrátu, bude rychlost reakce narůstat.

Jak je zřejmé, půjde o přímou závislost, rovnice pro tento průběh závislosti bude rovnicí přímky:

$$v = k \cdot c^1, \text{ tedy } v = k \cdot c, \quad \text{řád reakce}$$

kde v = rychlost reakce, k = rychlostní konstanta, c = koncentrace reagující látky a mocněnec „1“ je tzv. *řád reakce*, který vypovídá o počtu látek, na jejichž koncentraci závisí rychlost reakce.

V oblasti uvažovaných koncentrací látky S se rychlost reakce řídí kinetikou *prvního řádu* (srovnej s průběhem křivky v grafu).

S růstem koncentrace substrátu se rychlost zvyšuje proto, že stále více molekul enzymu se zapojuje do reakce a zvyšuje se množství reagujících molekul, tedy i produktu. Se zvyšující se koncentrací reagentu/substrátu, se však postupně rychlost reakce zpomaluje, protože je obsazováno stále více molekul enzymu, ale molekuly substrátu s k nim dostávají stále obtížněji, až je nakonec enzym zcela substrátem nasycen/saturován a rychlost reakce pak závisí již nikoliv na koncentraci substrátu, ale na *schopnosti enzymu v časovém úseku zpracovat substrát na produkt*. Tato schopnost se nazývá *číslo přeměny* a nabývá hodnot v intervalu 1 – 10 000 molekul za sekundu.

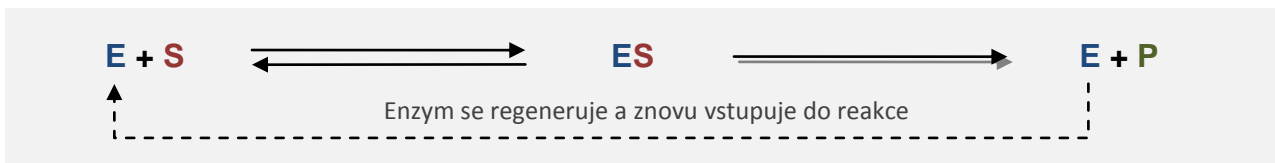
Křivka závislosti rychlosti na koncentraci se proto od určitých hodnot koncentrací ohýbá prakticky o 90° (rychlost dosáhla limitní hodnoty, dále se již nezvyšuje, je maximální) a zůstává konstantní. Rovnicí pro rychlost bude výraz:

$$v = k \cdot c^0, \text{ tedy } v = k \cdot 1, \text{ čili } v = k,$$

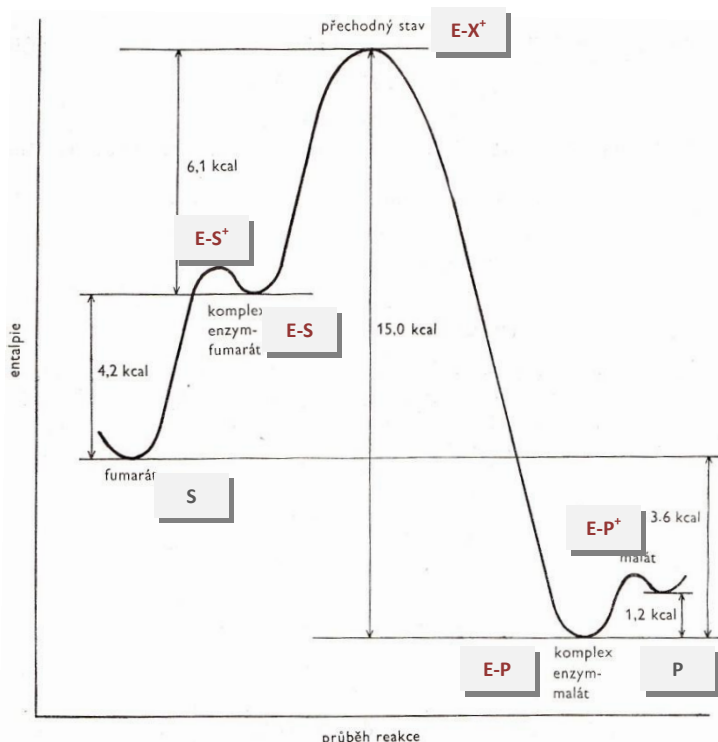
vyjádřeno slovy – rychlost rovná se konstantě neboli, je konstantní. Kinetika reakce se změnila na kinetiku *nultého řádu*. Kinetika nultého řádu je typická právě pro enzymové reakce s nadbytkem substrátu (ale také např. pro fotochemické reakce). Vícemolekulární reakce vedou ke kinetikám vyšších řádů.

Poznámka: Při nízké koncentraci substrátu probíhá enzymová reakce podle kinetiky prvního řádu (viz výš), tzn. se snižující se koncentrací substrátu, klesá rychlost reakce (s průběhem času jak se mění koncentrace substrátu, mění se i rychlost reakce).

Vlastní působení enzymu se vysvětluje tvorbou komplexu *enzym-substrát*. Podobně jako protilátky, využívají i enzymy svou schopnost vázat jiné makromolekuly či nízkomolekulární látky - ligandy. Tyto vazby jsou převážně nekovalentní, zejména se jedná o vodíkové můstky. Enzym váže ligand, zvaný v tomto případě *substrát*, v místě zvaném *aktivní centrum enzymu* a vytváří s ním komplex *enzym-substrát*, který se následně více či méně ochotně rozpadá na *produkty*.

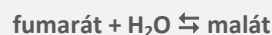


Průběh reakce z energetického hlediska je o něco složitější, než jak je uvedeno na obrázku na str. 15-1:



Graf podrobněji ukazuje změny energetických stavů při tvorbě komplexů enzym-substrát a enzym-produkt a přechodových stavů.

V tomto případě se jedná o reakci



Výše uvedené schéma je potom podrobnější:



S: substrát

E: enzym

E-S⁺: přechodový stav před tvorbou *E-S*

E-S: komplex enzym-substrát

E-X⁺: přechodový stav před tvorbou produktu

E-P: komplex enzym-produkt

Pevnost vazby komplexu **ES** je dána hodnotou *rovnovážné konstanty K*, které odpovídá příslušná volná energie komplexu. Čím vyšší hodnota rovnovážné konstanty, tím pevnější je vazba. Lze říci, že podle hodnoty rovnovážné konstanty komplexu ES lze usuzovat, který z mnoha případných substrátů je substrát „přirozený“ či „pravý“ – je to ten, který má *nejvyšší hodnotu K*.

Pro případ tvorby (asociace) komplexu ES lze napsat



Vyjádřeno slovně: Rychlost asociace látek *E* a *S* je rovna rychlostní konstantě asociace koncentrace *E* (skutečná koncentrace zmenšená o úbytek *E* do *ES*) násobené koncentrací substrátu.

Pro případ rozpadu/disociace komplexu ES lze napsat



Vyjádřeno slovně: Rychlost disociace komplexu *ES* rovná se rychlostní konstantě disociace násobené koncentrací komplexu *ES*.

V rovnováze jsou si obě rychlosti rovny: *rychlost asociace = rychlost disociace*

$$k_a \{[E] - [ES]\}[S] = k_d[ES]$$

a po matematické úpravě dostaneme vztah pro *rovnovážnou konstantu* K_s , která se pro enzymové reakce definuje opačně, než jak je v chemii zvykem, tzn., že je rovnovážnou konstantou *disociace* ES na E + S a nazývá se *substrátová konstanta*:

$$K_s = \frac{k_d}{k_a} = \frac{\{[E]-[ES]\}[S]}{[ES]}$$

V rovnovážném stavu se počet nově utvořených vazeb za časovou jednotku rovná počtu disociovaných komplexů.

Ze vztahu pro substrátovou konstantu lze dále odvodit

$$\{[E] - [ES]\}[S] = K_s[ES]$$

$$[E][S] - [ES][S] = K_s[ES]$$

$$[E][S] = K_s[ES] + [S][ES], \text{ z toho } [E][S] = [ES](K_s + [S])$$

a odtud

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_s + [S]}$$

Pro rychlost tvorby produktu (a regeneraci enzymu) platí



Rychlost rozpadu komplexu ES určuje celkovou rychlost reakce v ;

k_r je rychlostní konstanta tvorby produktu a zahrnuje koncentraci kteréhokoliv dalšího substrátu, který se může reakce zúčastnit.

Za předpokladu stálého udržování výše popsané rovnováhy, dostaneme po dosazení výrazu pro [ES] do rovnice pro rychlost reakce výraz

$$v = k_r \frac{[E][S]}{K_s + [S]}$$

Podmínkou dobrého průběhu enzymových reakcí je podmínka $[S] \gg [E]$, enzym je v tomto případě nasycen substrátem, tedy je všechen ve formě komplexu ES, reakce běží maximální rychlostí V a je nultého řádu vzhledem k substrátu (*další zvyšování koncentrace substrátu nevede ke zvýšení rychlosti enzymové reakce*). Odpovídající vztah pro rychlost disociace, která určuje celkovou rychlost enzymové reakce, je

$$V = k_r [E]$$

a po dosazení tohoto výrazu do předchozí rovnice obdržíme $v = \frac{V[S]}{K_s + [S]}$

Odkud plyne

$$K_s = [S] \left(\frac{V}{v} - 1 \right)$$

Pro $v = V/2$, čili běží-li reakce poloviční maximální rychlostí, výraz pro substrátovou konstantu nabývá jednoduchého tvaru $K_s = [S]$. Vyjadřuje zmíněnou skutečnost, a sice, že při této koncentraci substrátu běží reakce poloviční maximální rychlostí.

Konstanta K_s se v tomto případě označuje K_m , nazývá se *Michaelisovou konstantou*, či *konstantou Michaelise a Mentenové* a je charakteristickou konstantou každého enzymu, vyjadřuje schopnost substrátu účinně se vázat s enzymem, má rozměr koncentrace.

Nazvaná je podle badatelů Michaelise a Mentenové, kteří ji poprvé použili (v roce 1913).

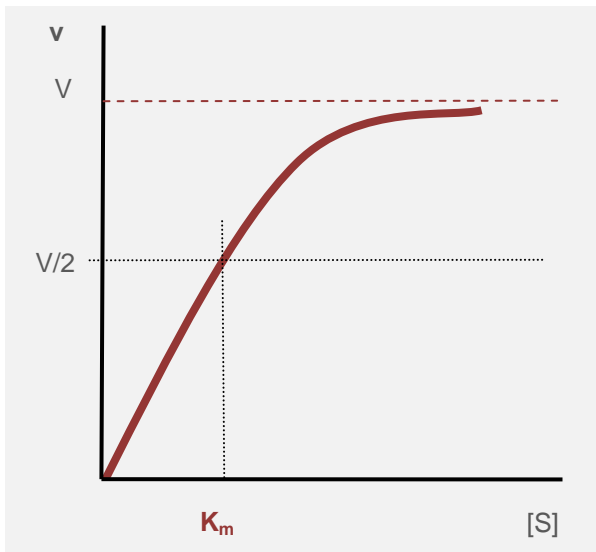


Maud Mentenová
kanadská lékařka



Leonor Michaelis
německý biochemik,
fyzikální chemik a
lékař

Konstanta Michaelise a Mentenové



$$K_m = S \times [(V/v) - 1],$$

po dosažení $v = V/2$,
zjednoduší se zlomek na
 $K_m = S \times [(2V/V) - 1] = S,$

jinými slovy, Michaelisova konstanta je rovna koncentraci substrátu, při které enzym pracuje svou poloviční limitní rychlostí.

V tomto případě platí, že čím nižší hodnota K_m , tím pevněji se substrát váže k enzymu, je to *reciproká* (opačná) hodnota afinity enzymu k substrátu.

Michaelisova konstanta je charakteristická veličina každého enzymu a má rozměr koncentrace [mol/l].

Pro většinu reakcí má K_m hodnotu v rozmezí $1 \cdot 10^{-1}$ až $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l.

Konkrétní mechanismus účinku enzymů (jakým snižují aktivační energii) je různý (pro zvědavé studenty):

- molekula enzymu změnil trojrozměrný tvar substrátu a uvede ho do takové polohy, že v něm vyvolá na příslušné vazbě pnutí, které navíc ovlivní vhodně umístěnými postranními řetězci aminokyselin tak, že dojde k snazšímu štěpení této vazby např. pomocí vody (hydrolýza) či jiným způsobem
- v reakcích s více ligandy většinou enzym umožní reaktantům vzájemnou orientaci optimální pro reakci následující (tj. tvorbu produktu či produktů) a navíc aktivní centrum enzymu obsahuje přesně umístěné atomy, které s použitím nabitých skupin a změnou rozdělení elektronů v substrátech tuto reakci urychlují
- mnohé enzymy přechodně vytvářejí kovalentní vazby mezi svým postranním řetězcem a substrátem; v následujících krocích se tvoří produkt a postranní řetězec se vrací do původního stavu

Na všechny rozmanité akce enzymů mnohdy nestačí pouhá molekula bílkoviny a reakce postranních řetězců aminokyselin, proto si enzymy berou „pomocníky“,

- se kterými buď volně spolupracují jako s určitou formou substrátu – tzv. *koenzymy/kofaktory* či také *kosubstráty*,
- nebo je mají kovalentně navázány na molekulu enzymu, kde tvoří tzv. *prostetickou skupinu* a spolu s enzymem jednotný celek.

Někdy roli „pomocníka“ zastávají kovové ionty (Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} aj., viz dále v textu „aktivátory“), jindy jsou to malé organické molekuly. Většinou si tyto molekuly nemůže organismus sám syntetizovat a musí jejich prekurzory přijímat ve formě *vitamínů* (typické jsou vitamín A, vitamíny skupiny B a další).

Alosterické enzymy obsahují dvě aktivní místa:

- jedno pro vazbu *substrátu*,
- druhé pro vazbu *regulační molekuly*.

Tato (regulační) molekula, navázáním se na regulační místo, změnil konformaci bílkovinné molekuly enzymu, což vede ke změně jeho enzymatické aktivity. Typickou regulační molekulou je fosfátová skupina – ta se ovšem váže kovalentně na postranní řetězec enzymu. Fosforylaci a defosforylaci podléhají tisíce enzymů a jsou takto ovlivňovány ve své aktivitě (srovnej též Kapitola 14, str.14-2, *Princip druhého přenašeče*). Vazbu malé molekuly na enzym lze přirovnat k vypínači: vazbou regulační molekuly se enzym buď „zapne“ nebo „vypne“, tj. projevuje či neprojevuje enzymatickou aktivitu. Takto jsou enzymy regulovány ve své činnosti. Většinou jde o *negativní zpětnou vazbu*, kdy produkt reakce brzdí/inhibuje funkci prvního enzymu v enzymovém řetězci. Ukázkou může posloužit působení cholesterolu na enzym *β -hydroxy- β -methyl-glutaryl CoA-reduktázu*, jak je uvedeno na str. 11-11. Podobný mechanismus může mít i opačný účinek, kdy dojde k posílení činnosti enzymu a pak se hovoří o *pozitivní zpětné vazbě*. Toto působení bude nejspíš v místě větvení metabolických drah a povede k „povzbuzení“ druhé možnosti syntézy z jednoho prekurzoru.

Kromě koncentrace substrátu ovlivňují rychlost reakce i správnou funkci enzymů další faktory:

Teplota (tepelné optimum)

Se vzrůstem teploty vzrůstá i rychlost katalyzované reakce, v průměru dojde s nárůstem teploty o 1 °C k vzrůstu reakční rychlosti o cca 10%. Po dosažení určité teploty, která je u každého enzymu jiná, dochází k denuraci jeho bílkovinné složky a tím ke zpomalení až zastavení katalyzované reakce. Tepelné optimum, tj. oblast teploty, kdy daný enzym vykazuje nejvyšší rychlost reakce, je u teplotokrevných organismů většinou kolem 37 °C. V laboratorní praxi je tudíž většinou teplota inkubační lázně právě 37 °C.

Koncentrace protonů, hodnota pH (pH optimum)

Enzymy tím, že jsou převážně bílkovinného původu, jsou velmi snadno ovlivnitelné změnou pH (disociací ionizovatelných skupin v aktivním centru enzymu dojde ke změně jeho vlastností, při jiném než optimálním pH může obecně molekula proteinu zaujmout jinou konformaci a tím rovněž dojde ke změně jejích vlastností apod.) případně může dojít k ovlivnění rychlosti reakce disociací funkčních skupin substrátu.

Většina enzymů má pH optimum v *neutrální či slabě kyselé oblasti*. Výjimkou jsou trávicí enzymy žaludku (pepsin, pH optimum 1,5 – 2,5) a pankreatu (trypsin 7,5 - 10, pankreatická lipáza 8,0).

V laboratorní praxi je optimální pH reakce zajištěno *ústojným roztokem* (puřem).

Efektory (aktivátory a inhibitory) ovlivňují aktivitu enzymů

Enzymovou katalýzu si je třeba představit jako regulérní chemickou reakci mezi katalyzátorem a substrátem (viz schéma reakce výš). Tato reakce je rovněž ovlivňována tzv. *efektory*, které v daném kontextu nazýváme v případě kladného účinku (podpora katalýzy) *aktivátory*, v případě opačném *inhibitory* (zpomalení či zastavení reakce)

- *aktivátory* - ionty potřebné pro aktivitu určitého enzymu (např. Zn^{2+} , Mn^{2+} a Co^{2+} jsou důležité pro činnost peptidáz, Cl^- aktivují amylázy a Mg^{2+} je nutný pro enzymy využívající jako kosubstrát ATP) V komerčních diagnostických soupravách jsou přítomny v optimálním množství.
- *inhibitory* - mohou poškodit enzym nevratně (*ireverzibilní* inhibice) nebo ho pouze zablokovat (*reverzibilní* inhibice)

Reverzibilní inhibice

- *nekompetitivní*: inhibitor ovlivní aktivní centrum tak, že se substrát ještě váže, ale průběh reakce se zpomaluje
- *kompetitivní* čili *soutěživá*: inhibitor soutěží se substrátem o vazbu na aktivním centru (podobně může reagovat i samotný substrát či produkt reakce (inhibice substrátem či produktem)
- *alosterická*: inhibitor se váže na enzym (v jiném místě než v aktivním centru) a způsobuje takovou změnu konformace jeho molekuly, že znesnadní či zcela znemožní vazbu substrátu

Iontová síla

Iontová síla je definována vztahem

$$\mu = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2,$$

kde c_i je koncentrace i -tého iontu a z_i je jeho mocenství.

Stručně se dá říct, že pro zdárný průběh reakce je potřeba zachovat také optimální koncentraci iontů v prostředí. U enzymově katalyzovaných reakcí může hrát roli stupeň naředění původního vzorku - dojde např. k nepřiměřenému naředění efektorů a tím k ovlivnění rychlosti reakce. Mnohdy hraje roli i *charakter* iontu, který je součástí pufru (např. zda se jedná o vlnan, jablečnan apod.).

Substrát

Každý enzym vykazuje, mimo jiné, tzv. *substrátovou specifitu*, (s některým substrátem běží reakce lépe jak s jiným, s některým běží nejlépe - k tomuto substrátu vykazuje enzym nejvyšší afinitu a předpokládá se, že se jedná o substrát *pravý*). Jak již bylo uvedeno, kvantitativně se dá vyjádřit afinita enzymu k určitému substrátu Michaelisovou konstantou K_m . V předchozím textu byl rovněž zdůrazněn význam koncentrace substrátu. Dále vykazují enzymy tzv. *specifitu účinku*, tzn. jedna látka, jeden substrát může být přeměněn na různé produkty.

Interkonverze

Další skutečností, která může ovlivnit enzymovou katalýzu je *interkonverze*. Je to fyziologický mechanismus, kterým se zapojují a odpojují enzymy z reakčních sledů a slouží hlavně jako regulační mechanismus metabolických pochodů (viz výš).

Stanovení enzymových aktivit by mělo probíhat za optimálních podmínek

Z výše uvedeného vyplývá, že analytické postupy sloužící ke stanovení enzymů, případně využívající enzymatickou aktivitu ke stanovení substrátů, by měly probíhat za *optimálních podmínek* pro daný enzym, tj. mělo by být optimální pH prostředí, iontová síla prostředí, charakter iontů tvořících pufr, koncentrace substrátu a jeho druh, typ a koncentrace koenzymu, efektoru, optimální teplota. Reakce by také měla probíhat po optimální dobu, aby jednak proběhla kvantitativně, ale aby nedocházelo např. k inhibici reakce produktem, k tepelnému rozkladu enzymu, k podpoře vedlejších soutěživých reakcí apod. Standardizací podmínek a výběr vhodných postupů propracovává skupina expertů **IFCC** (*International Federation of Clinical Chemistry*).

Komerční diagnostické soupravy

Komerční soupravy používané v klinických laboratořích (a využívající enzymy) se většinou na standardy IFCC odvolávají, tzn., že jsou uspořádány v souladu s požadavky IFCC. Z hlediska metodiky získání výsledku bývají uspořádány následujícími způsoby (srovnej též kapitola 3, odst. 3.8., Dodatek).

- metoda probíhá do *koncového bodu* (*end point*): po určité inkubační době dojde k rovnováze, rychlost tvorby produktů se vyrovná rychlosti přeměny produktů na původní analyty, rychlost reakce je ustálena a po definované době se nemění; předpokladem správné laboratorní práce je dodržet inkubační podmínky a dobu určenou pro změření absorbance produktů; příkladem takové metody je např. stanovení glukózy metodou *GOT/POD*
- *kinetické stanovení* (*rate = rychlost*): rovnovážný stav nenastane, reakce běží dostatečně rychle, aby bylo možno určit změnu absorbance za časovou jednotku, nejčastěji za 1 minutu = $\Delta A/\Delta t$, resp. $\Delta A/\text{min}$; pokud se pracuje manuálně, měří se obvykle absorbance za 3 časové úseky (3 x 1 minuta) a výsledkem je průměr tří měření; příkladem metody je např. stanovení *transamináz*. Automatický analyzátor má nastavenou optimální dobu měření, která se počítá na měřicí body.
- *stanovení v konstantním čase* (*fixed time*): reakce probíhá definovanou dobu a přesně po uplynutí této doby (při manuálním provedení) je zastavena inhibítorem – měří se absorbance za tuto dobu; předpokladem správné laboratorní práce je přesné dodržení časového intervalu; příkladem metody je stanovení *alkalické fosfatázy* (kde ovšem lze pracovat jak metodou konstantního času, tak kineticky). V automatickém analyzátoru dochází k přesnému odečtení v konkrétním čase, inhibitor se nepřidává.
- *stanovení dvoubodové, ve dvou bodech* (*two point, 2P*): reakce se nechá určitou dobu běžet, pak se změří (v prvním časovém bodu) počáteční hodnota absorbance a po uplynutí definovaného časového úseku se (ve druhém časovém bodu) změří konečná hodnota absorbance a vypočítá se rozdíl; toto stanovení má oproti např. metodě konstantního času tu výhodu, že se jedná o tzv. *diferenční (rozdílové) měření*. V tomto případě nevádí zakalená či zabarvená séra (pochopitelně v rámci určité intenzity a pokud nevádí chemii reakce).

Poznámka: Při práci s automatickým analyzátozem (i programovatelnými fotometry) jsou definované časové úseky přesně dodržovány (s přesností zlomků sekund) a nemusí být nutno reakci zastavovat inhibítorem (*fixed time*). Při manuální práci, zvl. při zpracování větších sérií to nutné je, a to i v případě dvoubodového provedení.

15.1.1. Vyjadřování hodnot enzymových aktivit

Katal (SI)

Je aktivita enzymu, která *katalyzuje přeměnu jednoho molu substrátu za 1 sekundu* [*mol/s*]

Mezinárodní jednotka IU (International Unit), resp. U (Unit)

Je aktivita enzymu, která *katalyzuje přeměnu jednoho mikromolu substrátu za 1 minutu* (tj. 60 sekund) [$\mu\text{mol}/\text{min}$] = [$\mu\text{mol}/60\text{s}$]

Poznámka: enzym s aktivitou jednoho katalu přemění za **60x kratší dobu 10^6 x (milionkrát!) větší látkové množství** (substrátu) než enzym s aktivitou jedné mezinárodní jednotky. Je tedy

U : 60 = μkatal čili 0,01667 U = μkatal a 60 μkat = U; pro menší násobky platí U x 16,67 = nkat; nkat x 0,06 = U.

Katalytická koncentrace

Je veličina, která představuje *aktivitu enzymu v jednotkovém množství plazmy, séra, moči či jiné tělní tekutiny, a to za definovaných podmínek* (teplota, pH, efektor, atd.). Je třeba si uvědomit, že se jedná o schopnost katalýzy určenou **množstvím enzymu** (jak říká sám název – katalytická koncentrace), a že nárůst či pokles aktivity enzymu je způsoben *změnou jeho koncentrace*, tedy jeho *množství*. Jednotkou je v mezinárodní soustavě jednotek SI [kat/l], v anglosaských zemích se stále používá [IU/l] resp. [U/l]. Protože se jedná o příliš velkou jednotku, užívají se v praxi hodnoty menší - [$\mu\text{kat/l}$], [nkat/l].

Pro přepočty mezi jednotkami koncentrací platí tyto vztahy: $U/l : 60 = U/l \times 0,01667 = \mu\text{kat}/l$; $\mu\text{kat}/l \times 60 = U/l$

Hmotnostní koncentrace (mass concentration)

[vyslov: mas konsntrejšn] je *hmotnost* enzymu uváděná v [g/l], případně v dílčí jednotce. Stanovuje se *imunochemicky*, nevyjadřuje katalytickou aktivitu či schopnost enzymu katalyzovat, ale jeho *množství*. Pomocí specifické protilátky lze stanovit velmi malá množství enzymu, případně i jeho částečně degradované molekuly. Metoda je nezávislá na přítomnosti aktivátorů či inhibitorů a podléhá stejným pravidlům, jako jiná imunochemická stanovení (viz kapitola 10).

15.1.2. Kalibrace enzymových analýz

Enzymové analýzy lze kalibrovat

- *produktem reakce* nebo použitím
- *enzymového kalibrátoru*.

Mnohé diagnostické soupravy používají kalibrační faktor, který vychází z Lambertova-Beerova zákona (zejména při využití UV testu, tj. koenzymů NAD/NADH, NADP/NADPH), jsou tedy nakalibrovány již výrobcem soupravy.

Kalibrace produktem reakce

Připraví se sada standardních roztoků tak, že se (barevný) produkt reakce naředí na koncentrace odpovídající podle stechiometrie reakce příslušným aktivitám daného enzymu. Fotometricky se proměří a naměřené absorbance se vynesou do kalibračního grafu (analytické křivky), který vyjadřuje závislost absorbance na aktivitě enzymu.

Poznámka: V současnosti se tento postup doporučuje např. při kalibraci metody pro stanovení sérové ALP (alkalické fosfatázy), a to i na automatických analyzátorech: *Substrátem je p-nitrofenylfosfát, produktem reakce je odštěpený p-nitrofenol (a kyselina fosforečná, resp. fosfát), látka žluté barvy, fotometrovatelná v oblasti 400 – 410 nm. Ze stechiometrie reakce lze vypočítat koncentraci p-nitrofenolu odpovídající příslušným aktivitám ALP, tyto koncentrace připravit a sestrojit kalibrační graf.*

Kalibrace s použitím enzymového kalibrátoru

Použije se enzymový standard (enzymový kalibrátor), tj. sérum s deklarovanou hodnotou aktivity příslušného enzymu. Toto sérum se zpracuje stejně jako vzorek a ze zjištěné hodnoty absorbance se (při znalosti aktivity enzymu v kalibrátoru) přímou úměrou vypočítá aktivita enzymu v neznámém vzorku (resp. automatický analyzátor si sestrojí kalibrační graf ze dvou bodů – nulové hodnoty a hodnoty kalibrátoru).

15.2. Klasifikace enzymů

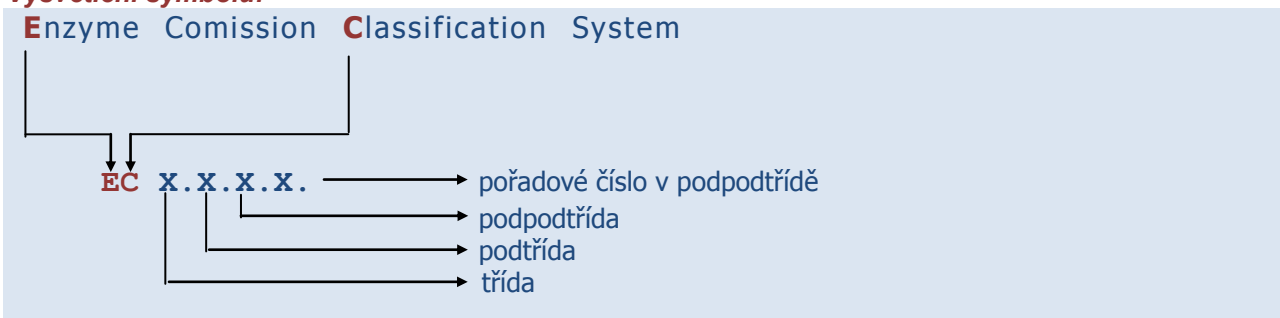
Enzymy se podle mezinárodní klasifikace a názvosloví dělí do *šesti tříd*:

TŘÍDA	NÁZEV SKUPINY	TYPY REAKCÍ KATALYZOVANÝCH PŘÍSLUŠNOU TŘÍDOU ENZYMŮ
1.	Oxidoreduktázy	redoxní reakce mezi dvěma substráty
2.	Transferázy	přenos skupin mezi dvěma substráty
3.	Hydrolázy	hydrolytické štěpení kovalentní vazby
4.	Lyázy	štěpení kovalentní vazby bez účasti vody
5.	Isomerázy	intramolekulární přesuny (skupin) atomů
6.	Ligázy	syntéza vazeb C-C, C-S, C-N, C-O

Systematické označení příslušného enzymu sestává z dvou písmen a čtyř číslic a názvu - např.:

EC 3.1.3.1. Fosfhydroláza monoesterů kyseliny trihydrofosforečné (alkalické optimum), Alkalická fosfatáza

Vysvětlení symbolů:



Kromě tohoto *systematického* či *vědeckého* názvosloví se běžně užívá názvosloví *obecně užívané* – laktátdehydrogenáza, kreatinkináza, amyláza apod. (toto názvosloví ukazuje obvykle substrát reakce a případně i způsob jeho přeměny) a názvosloví *triviální* – pepsin, trypsin apod.

Přehled typů názvosloví enzymů:

- systematické (vědecké): *EC XXXX*
- obecně užívané: *kreatinkináza*.
- triviální: *pepsin...*

Přehledný seznam enzymů včetně užívaných názvosloví ve [Wikipedii](#)

15.3. Význam enzymů a enzymologie v medicíně

1. Znalost enzymologie je důležitá pro *pochopení normálních a patologických pochodů* v organismu
2. Praktické využití
 - a. enzymy slouží jako *indikátory patologických procesů* (stanovují se katalytické koncentrace konkrétních enzymů, z jejichž hodnot soudí lékař na diagnosu či průběh terapie, přičemž pochopitelně využívá i další informace plynoucí z procesu tzv. základního či speciálního vyšetření pacienta)
 - b. enzymy slouží jako *specifická činidla* pro stanovení různých analytů (pomocí enzymů se specificky stanoví koncentrace látek, z jejichž hodnot lékař soudí na diagnosu, její správnost, průběh léčby atd., viz výš)
 - c. enzymy se používají k *léčbě* (např. trávicí enzymy)

Pro praktické použití uvedené v bodě 2.a. se vzhledem ke své relativně snadné dostupnosti (odběr krve ze žíly) využívají nejčastěji plasmatické (sérové) enzymy, často i enzymy obsažené v moči (amyláza). Enzymy sloužící jako specifická činidla (bod 2.b.) jsou součástí komerčně připravených diagnostických souprav.

15.4. Plasmatické enzymy můžeme rozdělit do dvou skupin

15.4.1. Enzymy buněčné vykonávají svou funkci uvnitř buňky

Enzymy buněčné vykonávají svou funkci v místě svého vzniku, tj. uvnitř buňky (intracelulárně). Objevují se v okamžitých množstvích v plazmě jako odpadní produkty buněk, ale jejich koncentrace může enormně vzrůst v případě buněčného poškození či nekrózy - při poškození buněk se tyto enzymy uvolňují a dostávají se do krevního oběhu, kde lze naměřit jejich zvýšenou aktivitu. Patří sem většina enzymů užívaných v klinicko-biochemické diagnostice (ALT, AST, CK, LD, GGT aj.)

15.4.2. Sekreční enzymy jsou vylučované exokrinními žlázami

Enzymy vylučované (secernované) do vnějšího prostředí exokrinními žlázami. Působí v místě odlišném od místa svého vzniku.

Dělí se dále na

- *Enzymy produkované velkými žlázami gastrointestinálního traktu* (slinné žlázy, pankreas); tyto enzymy se příslušnými vývody dostávají do GIT, hydrolyzují zde bílkoviny, lipidy a škrob z potravy; při onemocnění produkujícího orgánu se tyto enzymy dostávají ve zvýšené míře do krevního oběhu. V případě *snížení funkce orgánu*, který enzym vylučuje, dojde v plazmě ke snížení, případně vymizení příslušného enzymu (pankreatická amyláza)
- *Enzymy produkované hepatocyty* a secernované do krve, kde se uplatňuje jejich funkce (většina koagulačních faktorů, cholinesteráza)

15.4.3. Další možnosti dělení enzymů

Dělení podle různého obsahu enzymu ve tkáních (orgánech)

- *enzymy orgánově specifické* – např. *sorbitoldehydrogenázu* lze najít pouze v hepatocytech – její zvýšené aktivity v séru znamenají jednoznačně poškození jater
- *enzymy s řádovým rozdílem jejich obsahu v různých orgánech* – AST převažuje ve svalech, erythrocytech a játrech, ALT v játrech, CK ve svalech a ACP v prostatě – v laboratorní práci je nutno s touto skutečností počítat: např. nález zvýšené hodnoty aktivity AST v hemolytickém séru může být (ale nemusí) způsoben pouze lýzou erythrocytů, zvýšená hodnota aktivity CK v krevním séru může být způsobena předcházející resuscitací pacienta, masáží, tělesnou aktivitou apod.
- *enzymy ubikviterní*, tj. enzym se nachází ve většině tkání těla

Dělení podle subcelulární lokalizace enzymu

Cytoplazma:	LD, ALT
Mitochondrie:	GMD, mAST
Ribozomy:	CHS, koagulační faktory (proteázy)
Lyzosomy:	ACP, peptidázy a jiné hydrolázy
Buněčná membrána:	GGT, ALP

Různý stupeň poškození buňky vede k vyplavení různých enzymů do krevního séra – např. lehké poškození hepatocytů vede k vyplavení ALT a cytoplazmatické AST, těžké poškození, tj. poškození včetně mitochondrií, vede ke značně zvýšeným aktivitám především AST, způsobených vyplavením mitochondriální AST do krevního séra.

Dělení podle biologického poločasu enzymu

Jednotlivé enzymy krevní plazmy se značně liší svým *biologickým poločasem*, tj. dobou, za kterou by jejich aktivita klesla na polovinu, kdyby nebyl enzym do plazmy doplňován ze tkání:

AMS	3 – 6 hodin
AST	17 hodin
ALT	2 dny
LD₁	3 dny
LD₅	10 hodin
ALP	10 dní
CHS	10 dní

Biologický poločas určuje dobu, po kterou bude aktivita enzymu v krevním séru zvýšená (po infarktu myokardu bude v krvi přetrvávat déle aktivita LD₁ než AST, u rekonvalescentů po hepatitidě klesá rychleji aktivita AST než ALT).

15.5. Izoenzymy a makroenzymy

Izoenzymy jsou molekuly enzymů, které katalyzují stejnou reakci, ale jejichž bílkovinná molekula se liší *primární strukturou* a tedy i *fyzikálně-chemickými vlastnostmi* (rozdílná elektroforetická pohyblivost, odlišná termostabilita, různá citlivost k inhibitorům, rozdílné reakce se specifickou protilátkou apod.). Jsou produkty *různých genů*. Praktické využití je zejména tam, kde enzym může pocházet z více zdrojů (tkání) a jednotlivé tkáně se liší poměrem izoenzymů – typický příklad je LD, případně každá tkáň obsahuje typický orgánově specifický izoenzym, případně izoformu (ALP). Kromě pojmu *izoenzym*, lze se setkat i s pojmem *izozym/izozymy*.

Alelozymy jsou produkty *alelického genu*, často se nazývají také *izoenzymy*. Příklad těchto „izoenzymů“ viz na str. 15-28.

Izoformy enzymů (nepravé izoenzymy) – jejich odlišnost je dána různým obsahem glycidů v molekule (modifikace produktu stejného genu, posttranslační změny). Jsou produkty *stejného genu* (str. 15-22).

Makroenzymy jsou polymery enzymů, případně vznikají vazbou imunoglobulinu (IgG, IgA) na molekulu enzymu. Od „normálních“ enzymů se liší jak velikostí molekuly, tak biologickým poločasem (rychlostí odbourávání), který je delší (v séru mohou přetrvávat zvýšené aktivity příslušného enzymu, což může vést k nesprávným interpretacím při neznalosti této problematiky). Příčina vzniku je neznámá. Typickým příkladem je nález *makroamylázy*, případně *makro CK*.

Přehled

Izoenzymy	rozdíly v primární struktuře, produkty <i>různých</i> genů
Alelozymy	rozdíly v primární struktuře, produkty <i>stejných</i> genů existujících ve více <i>mutacích</i> , <i>alelách</i>
Izoformy enzymů	primární struktura stejná, modifikace molekuly (např. stupeň glykace), produkty <i>stejného</i> genu
Makroenzymy	<i>polymery</i> enzymů nebo <i>komplex</i> enzymu s imunoglobulinem, příčina vzniku neznámá

Jedno stanovení enzymů nestačí, hladina enzymů v plazmě totiž závisí na několika faktorech:

- na rychlosti, s jakou se enzym v plazmě objeví
- na rychlosti eliminace (odstraňování) enzymu z plazmy (močí, žlučí, odbouráním – biologický poločas)
- na celkovém objemu plazmy, který se může měnit

Je zřejmé, že tyto faktory budou různé u různých jedinců, ale i u jednotlivců se mohou měnit v závislosti např. na denní době, stavu organismu, poloze pacienta, denním režimu atd., atd.

15.6. Speciální enzymologie

15.6.1. Oxidoreduktázy

Oxidoreduktázy katalyzují oxidačně redukční reakce mezi dvěma substráty.

15.6.1.1. Laktátdehydrogenáza

Systematické názvosloví: EC 1.1.1.27; L-laktát: NAD⁺ oxidoreduktáza

Zkratka: LD, LDH

Dřívější název: Laktikodehydrogenáza

Enzym objevený v roce 1919 Mayerhofem; tetramerní enzym (složený ze čtyř podjednotek) s relativní molekulovou hmotností 140 000 (4 x 35 000); enzym vykazuje absolutní specifitu na „L-“ formu substrátu.

Výskyt v buňce

Cytosol

Výskyt v organismu

Laktátdehydrogenáza se nachází prakticky v každém orgánu (i v erythrocytech – hemolýza!) – při jeho poškození se dostává do krevního oběhu. Problém je v tom, že se prakticky nedá určit z kterého orgánu to je. Proto je cennější vyšetřovat jednotlivé izoenzymy (viz dál) než celkovou aktivitu LD.

Hladina v séru

2,30 – 4,80 $\mu\text{kat/l}$ (pro soupravu Dialab, optický test)

Izoenzymy LD

Laktátdehydrogenáza je enzym složený ze čtyř podjednotek (protomerů, monomerů) dvou typů, které mají původ v různých tkáních:

- **H:** heart [*vyslov: hárt*] – srdce (výskyt převážně v myokardu)
- **M:** muscle [*vyslov: más*] – svaly (výskyt převážně ve svalech a v játrech)



Pět kvartérních izoenzymů laktátdehydrogenázy vzniklých kombinací dvou podjednotek

Poznámka: spermie obsahují LD složenou z jiných podjednotek

Kombinací podjednotek vzniká pět izoenzymů, které lze dělit elektroforeticky:

Izoenzym	Složení z podjednotek	Směr ELFO	Výskyt v organismu
LD ₁	H4		v orgánech s převládající aerobní glykolýzou myokard, erythrocyty, ledviny (<i>inhibice oxalátem</i>)
LD ₂	H3M1		slezina, plíce, lymfatické uzliny, trombocyty, endokrinní žlázy
LD ₃	H2M2		v orgánech s převládající anaerobní glykolýzou játra, kosterní svalstvo (<i>inhibice močovinou</i>)
LD ₄	H1M3		
LD ₅	M4		

LD₁ obsahuje 10x více Asp a 5x míň Arg jako LD₅

LD₄, LD₅ jsou termolabilní – zahřívání při 65 °C po dobu 5 minut vede ke 100% inaktivaci

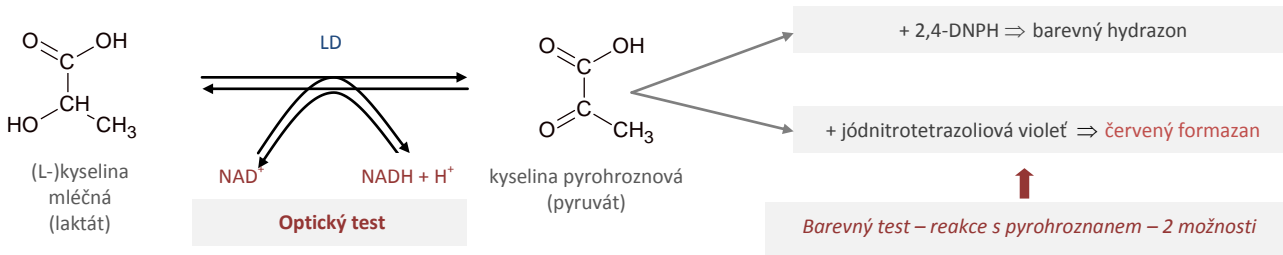
LD₁ + LD₂ = α -HBD (první dva izoenzymy se nazývají α -hydroxybutyrátdehydrogenáza)

Podíl LD stabilní vůči močovině tvoří 60 – 80% celkové aktivity LD

Úloha laktátdehydrogenázy v organismu

Laktátdehydrogenáza katalyzuje reverzibilní oxidaci laktátu na pyruvát (viz rovnici na následující straně). Je přítomna ve všech tkáních, vždy přítomna v buněčné cytoplazmě.

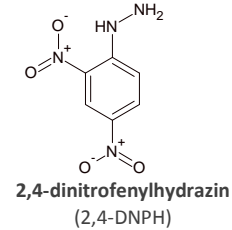
Metody stanovení celkové aktivity LD vycházejí z následující rovnice:



Existují postupy a diagnostické soupravy pro oba směry reakce: L \rightarrow P i P \rightarrow L
Od 1. ledna 2006 je (v ČR) závazná metoda, ve které je laktát (L) přeměňován na pyruvát (P).

Barevný test

Kyselina pyrohroznová (pyrohrozn, pyruvát) může reagovat s
 - 2,4-dinitrofenylhydrazinem (2,4-DNPH) na barevný hydrazon
 - jódnitrotetrazoliovou violetí na červený formazan.



Bývalá diagnostická souprava PLIVA-Lachema Diagnostika:

LD50, tvorba červených formazanů, fotometrie v pásmu 500 – 530 nm; norma hodnot 0,66 – 2,66 $\mu\text{kat/l}$

Optický test: Využívá se přechodu mezi oxidovanou a redukovanou formou NAD

Příklady diagnostických souprav

Laktátdehydrogenáza LDH-P „Diakit“ od firmy DIALAB; „P“ v názvu soupravy označuje, že reakce probíhá (podle rovnice uvedené výš) zprava doleva, pyruvát je redukován na laktát, tzn., je využíváno přechodu z redukované formy NAD na formu oxidovanou, směrnice přímký je tedy se záporným znaménkem .

Diagnostické soupravy Erba Lachema s.r.o.:

Laktátdehydrogenasa Liquid 100 (LD L 100), tvorba laktátu, referenční hodnoty 3,5 – 7,7 $\mu\text{kat/l}$

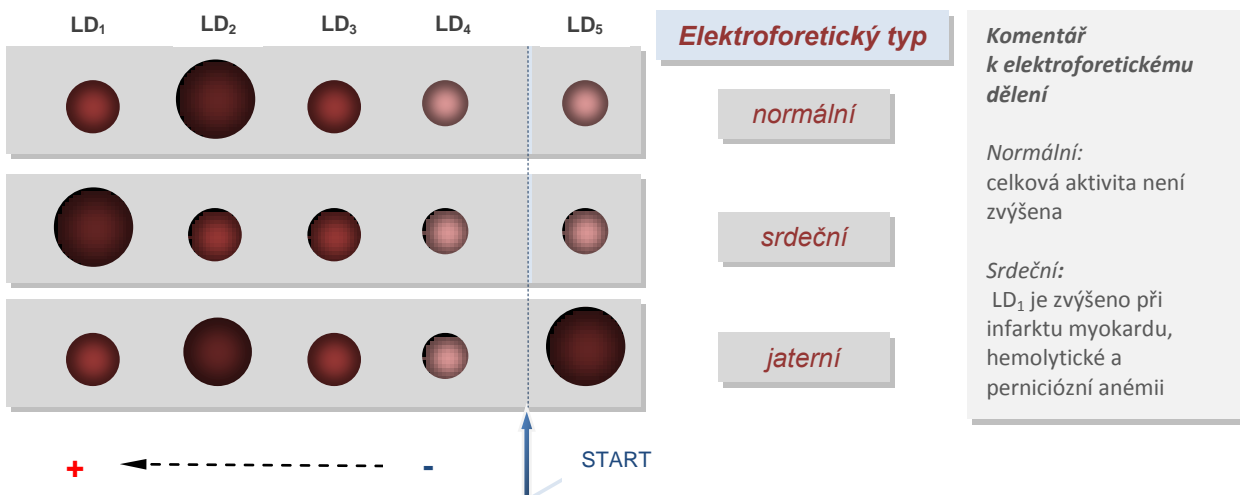
Laktátdehydrogenasa –L Liquid 100 (LDH-L L 100), tvorba pyruvátu, referenční hodnoty – muži <4,13 $\mu\text{kat/l}$, ženy <4,12 $\mu\text{kat/l}$.

Stanovení jednotlivých izoenzymů

- **Elektroforéza** (agarový, agarózový, polyakrylamidový, škrobový gel, CAF – fólie z acetylované celulózy, Hydragel).
- **Inaktivací či inhibicí** lze eliminovat jednotlivé izoenzymy a výsledek porovnat s výsledkem stanovení celkové aktivity LD, tj. bez inaktivace či inhibice. Využívá se teplotní inaktivace (LD₄ a LD₅), či inhibice močovinou (LD₅) nebo šťavelanem (LD₁).
- **Ionexová chromatografie** – chromatografické dělení na ionexech.

Elektroforéza je zřejmě nejobvyklejším postupem: po rozdělení izoenzymů ve stejnosměrném homogenním elektrickém poli následuje ponor fólie či desky s rozdělenými izoenzymy do barvicího roztoku, dojde k tvorbě barevných formazanů a následuje denzitometrie.

Je možno získat 3 elektroforetické typy isoLD

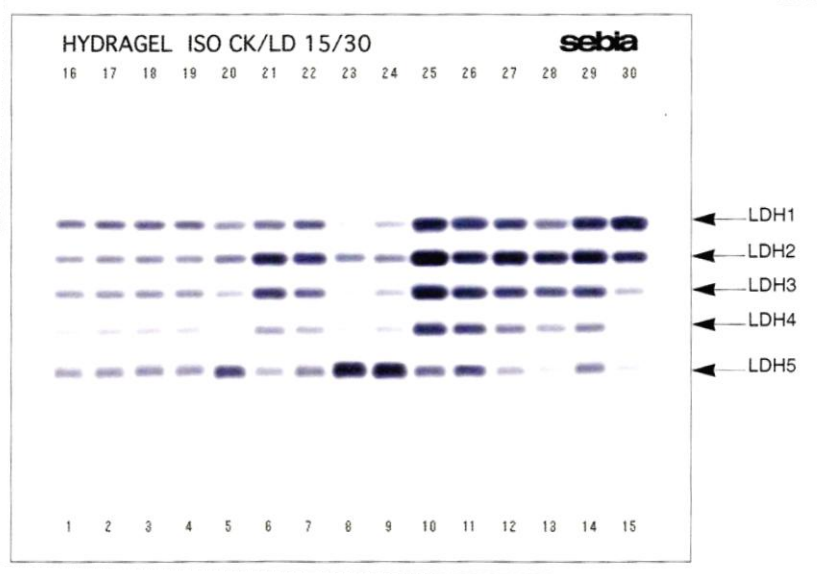


Dynamika LD při infarktu myokardu

po příhodě	8 - 12 hodin	zvýšeno
	48 – 25 hodin	maximum
	8 – 12 dní	návrat do původního stavu

Jaterní: LD₅ je zvýšeno u akutní i chronické hepatopatie a při poškození svalstva.

Poznámka: dříve hojně využívané stanovení aktivity LD, včetně izoenzymů, u infarktu myokardu je v současné době na ústupu, protože existují jiné markery infarktu myokardu (IM), zejména troponiny, myoglobin apod. LD má význam spíše jako „pozdní“ marker IM, dá se potvrdit „dozadu“ (ex post) jestli IM byl nebo ne, protože návrat k původním hladinám po srdeční příhodě nastává až po několika dnech (viz výš).

Elektroforeogram izoenzymů laktátdehydrogenázy na agarosových foliích Hydragel ISO CK“LD 15/30 firmy Sebia**Klinické poznámky**

Vyšetření laktátdehydrogenázy se dříve indikovalo především v případech podezření na infarkt myokardu (viz poznámka výš) a při sledování infarktu myokardu. Indikace stanovení je při podezření na plicní embolizaci, při diferenciaci žloutenek, u podezření na hemolytickou anemii, u diagnóz orgánového poškození (pomocí kvantitativní analýzy izoenzymů), u nemocí kosterního svalstva (*rhabdomyolýza* – viz dále *klinické poznámky* u kreatinkinázy), u intravaskulární hemolýzy, při diagnóze maligních onemocnění, při hepatopatii a sledování terapie všech uvedených onemocnění.

Celková aktivita v plazmě závisí na podílu konkrétního izoenzymu uvolňovaného do plazmy z tkání a na rychlosti eliminace izoenzymu a jeho podjednotek. Tak například jaterně specifická LD₅ (M4) má biologický poločas 8 – 12 hodin, což je asi desetina biologického poločasu izoenzymu LD₁ (H4) typického pro srdeční sval a erytrocyty. *Enzymové rozdělení typické pro jaterní onemocnění je tak patrné podstatně kratší dobu, než enzymové rozdělení typické pro hemolýzu či poškození myokardu, které tak může být měřeno po mnohem delší časové období.*

Laktátdehydrogenáza nacházená v séru při *Duchennově muskulární dystrofii* sestává převážně z izoenzymů LD₁ až LD₃ a ne z izoenzymu LD₅ příslušného zdravým skeletálním svalům. Je to pravděpodobně způsobeno geneticky podmíněnou neschopností jedince tvořit dostatečné množství podjednotky M.

Poměr LD/AST se používá pro rozlišení mezi prehepatální a hepatální žloutenkou. Pro hepatální ikterus svědčí hodnoty >5. Tyto hodnoty se mohou objevit i u metastatických onemocnění jater a u infekční mononukleosy.

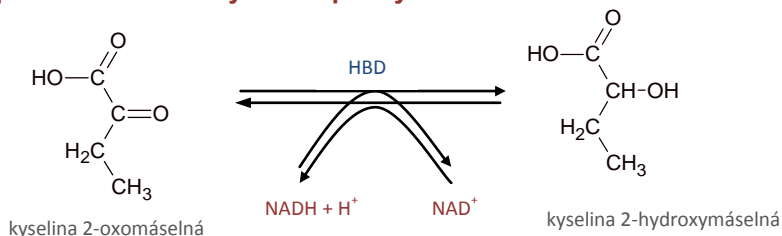
15.6.1.2. Alfa-Hydroxybutyrátdehydrogenáza

HBD, HBDH; jsou to první dva izoenzymy LD (LD₁ + LD₂)

Výskyt v organismu

Srdce, mozek, erytrocyty

Princip stanovení aktivity HBD optickým testem



Optický test, UV oblast, kinetické měření

Směrnice je záporná, absorbující látka NADH+H⁺ v reakční směsi ubývá

Klinické poznámky

Stanovuje se při infarktu myokardu (viz „Laktátdehydrogenáza“)

Poznámka: v současné době se stanovení aktivity HBD prakticky nepožaduje – existují jiné markery IM (infarktu myokardu), např. troponiny

15.6.1.3. Glutamátdehydrogenáza

Systematické názvosloví: EC 1.4.1.3; L-glutamát:NAD(P)⁺ oxidoreduktáza, deaminující

Zkratka: GMD, GLD

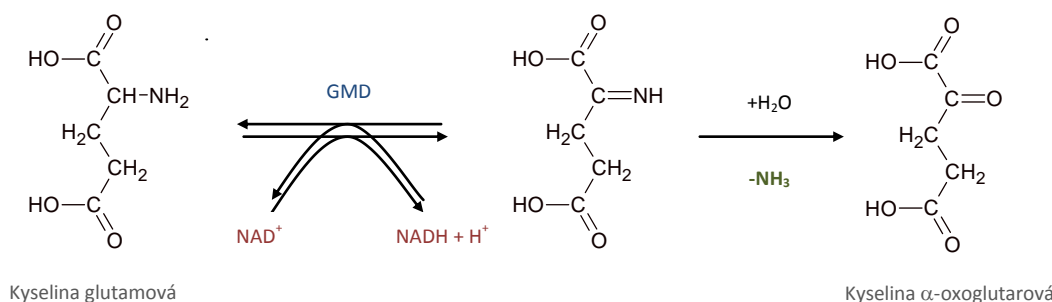
Výskyt v buňce

Výhradně v mitochondriích

Výskyt v organismu

Jaterní buňka; za normálních okolností je její aktivita v séru zanedbatelná, objevuje se v něm jako výraz nekrózy jaterních buněk.

Úloha GMD v organismu



Optický test, UV oblast, kinetické měření

Směrnice je kladná, absorbující látka NADH+H⁺ v reakční směsi přibývá

Glutamátdehydrogenáza katalyzuje *oxidační deaminaci* kyseliny glutamové (přes příslušnou *ketoiminovou kyselinu*).

Klinické poznámky

Glutamátdehydrogenáza je indikována k laboratornímu vyšetření při hodnocení závažnosti a rozsahu akutního poškození jaterního parenchymu a při diferenciaci diagnostice jaterních chorob.

15.6.2. Transferázy

Transferázy jsou přenašeči skupin. Transaminázy (aminotransferázy) katalyzují přeměnu α -oxokyselin na aminokyseliny přenosem aminoskupin. Diagnosticky nejdůležitější jsou ALT a AST.

15.6.2.1. Alaninaminotransferáza

Systematické názvosloví: EC 2.6.1.2; L-alanin:2-oxoglutarát-aminotransferáza

Zkratka: ALT, ALAT

Dřívější název: Glutamátpyruvát transamináza, GPT

Výskyt v buňce

Pouze v cytosolu (převážně v hepatocytu) \Rightarrow indikátor poškození buněčné membrány

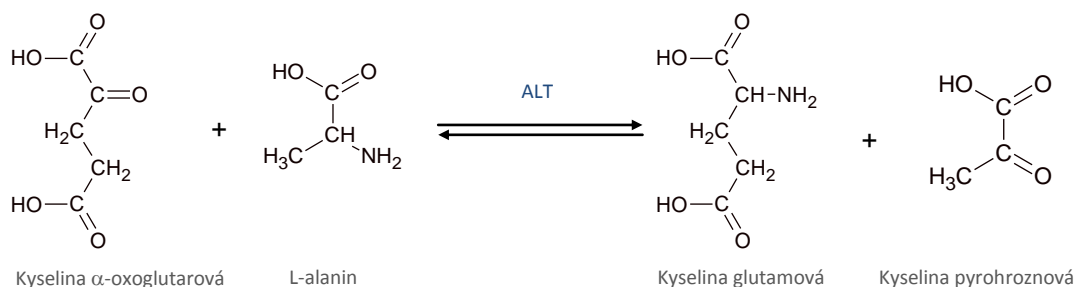
Výskyt v organismu

V játrech, v příčně pruhovaném svalstvu (10x méně jak v játrech)

Hladina v séru (platí pro kinetické UV stanovení)

nízká – u mužů do 0,8 μ kat/l a u žen do 0,6 μ kat/l

Úloha ALT v organismu – transaminace:

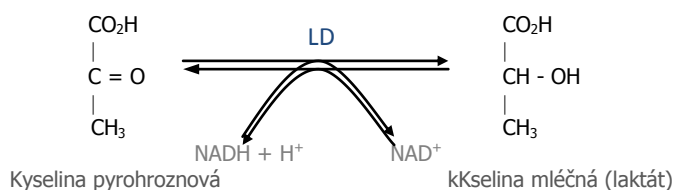


Stanovení aktivity ALT

Barevný test: End point, Reitman-Frankel; substrátem je kyselina α -oxoglutarová a L-alanin, vytvořená kyselina pyrohroznová reaguje s dinitrofenylhydrazinem na dinitrofenylhydrazon kyseliny pyrohroznové, jehož vybarvení se stabilizuje alkalizací prostředí (přidá se NaOH). Metoda byla svého času velmi rozšířena, v současné době je opuštěna a pro rutinní vyšetření aktivity ALT se nedoporučuje.

Bývalá diagnostická souprava PLIVA-Lachema Diagnostika: ALT 360, resp. ALT-AST 180; norma hodnot byla do 0,42 μ kat/l

Optický test: kinetické stanovení; princip stanovení je zřejmý z následující reakce

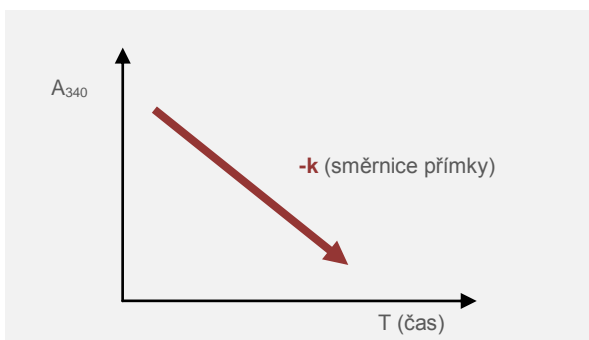


Optický test, UV oblast, kinetické měření

Směrnice je kladná nebo záporná? (Absorbující látka NADH+H⁺ v reakční směsi přibývá nebo ubývá?)

Transaminací vytvořená kyselina pyrohroznová je redukována pomocí laktátdehydrogenázy (LD) na kyselinu mléčnou, přitom dochází k oxidaci NAD. Tato změna je sledována v UV oblasti (nejčastěji 340 nm). Měří se změna absorbance za časovou jednotku (1 minutu). Směrnice přímky má negativní znaménko.

Obecný průběh závislosti absorbance na čase při stanovení katalytické koncentrace ALT



Příklady diagnostických souprav Erba Lachema s.r.o.

ALT UV 10x100 P
ALT UV 6x100 P
ALT UV L 250_500

Klinické poznámky

↑ Vzestup hladiny v séru:

- jaterní onemocnění: vzestup již v prodromálním stadiu, de Ritisův kvocient (AST/ALT) 1-2 měsíce u zánětu (hepatitis) menší jak 1 (uvolňuje se pouze cytozolová AST)
- infarkt myokardu: 3-6 dnů po příhodě, díky následné jaterní anoxii
- svalová dystrofie

15.6.2.2. Aspartátaminotransferáza

EC 2.6.1.1; L-aspartát:2-oxoglutarát-aminotransferáza; AST, ASAT

Dřívější název: Glutamátalacetát transamináza, GOT

Výskyt v buňce

Buňka obsahuje 2 izoenzymy, které dávají celkovou aktivitu

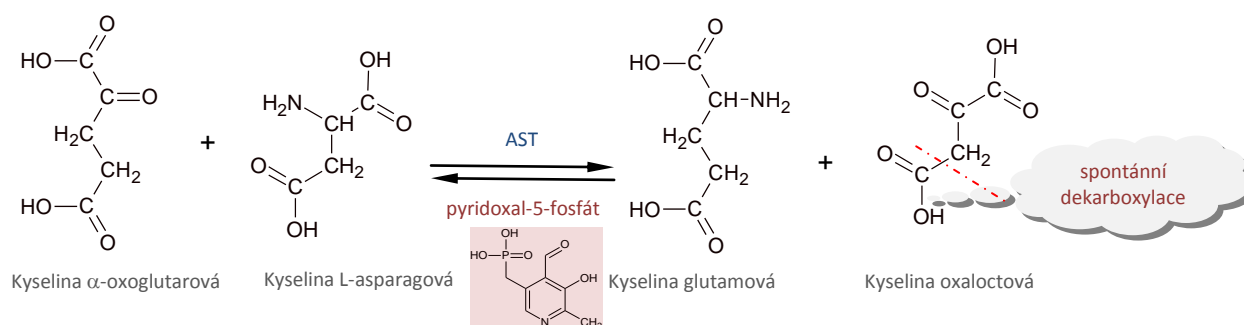
- v cytosolu, cAST (indikátor poškození buněčné membrány)
- v mitochondriích, mAST (indikátor poškození mitochondriální membrány)

Výskyt v organismu

- v myokardu
- v játrech
- v mozku
- v příčně pruhovaném svalstvu
- v ledvinách
- v membráně eryocytů (při hemolýze dochází k vzestupu katalytické koncentrace AST v krvi!)

Hladina v séru (platí pro kinetické UV stanovení): nízká – do 0,85 $\mu\text{kat/l}$ u mužů a do 0,6 $\mu\text{kat/l}$ u žen

Úloha AST v organismu – transaminace:



Poznámky: AST ke své činnosti vyžaduje pyridoxal-5-fosfát, při jeho nedostatku v organismu může dojít k falešně nižším nálezům..

Stanovení aktivity AST

Barevný test: End point, Reitman-Frankel; substrátem je kyselina α -oxoglutarová a kyselina L-asparagová, vytvořená kyselina pyrohroznová (po spontánní dekarboxylaci kyseliny oxaloctové) reaguje s dinitrofenylhydrazinem na dinitrofenylhydrazon kyseliny pyrohroznové, jehož zbarvení se stabilizuje alkalizací prostředí (přidá se NaOH). Výsledné zbarvení je hnědočervené. Metoda byla svého času velmi rozšířena, v současné době je opuštěna a pro rutinní vyšetření aktivity AST se nedoporučuje.

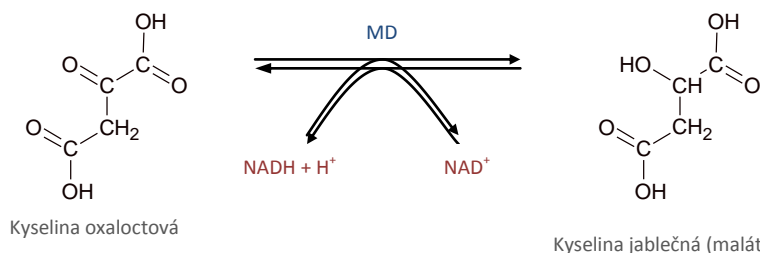
Bývalá diagnostická souprava PLIVA-Lachema Diagnostika: AST 360, resp. ALT-AST 180; norma hodnot byla do 0,56 $\mu\text{kat/l}$

Pro zvědavé studenty: Kvalitativní barevný test pro rozlišení zvýšených a normálních hodnot AST v séru dárců krve je založen na reakci barviva *Fast violet B* (diazoniová sůl 6-benzamido-4-metoxy-m-toluidinu) s kyselinou oxaloctovou, kdy vzniká sloučenina žlutohnědé barvy. Tento test byl svého času užíván na transfuzních odděleních (stanicích) pro vyloučení nevhodných dárců. V současnosti se používá stanovení obou transamináz kvantitativně optickým testem.

Optický test: kinetické stanovení; princip stanovení je zřejmý z následující reakce – kyselina oxaloctová je redukována malátdehydrogenázou (MD) na kyselinu jablečnou (malát). Sleduje se úbytek absorbance při 340 (366) nm za časovou jednotku

Příklady diagnostických souprav Erba Lachema s.r.o.: AST UV 10x100 P, AST UV 6x100 P, AST UV L 250_500

Princip stanovení



Poznámka: pro stanovení aktivity AST podle pravidel IFCC je nutno vzorek séra (plazmy) předem inkubovat (preinkubovat) s pyridoxal-5-fosfátem

Stanovení izoenzymů AST

pro dynamické sledování průběhu infarktu myokardu či těžkých hepatitid (de Rittis >1)

1. Elektroforéza (*agar, agaróza, škrob, folie acetylované celulózy...*)
2. Chromatografické metody
3. Imunologie (imunochemicky)
4. Kinetická diferenciacce
5. Isoelektrická fokusace



Klinické poznámky

Vzestup hladiny v séru

- poškození myokardu: vzestup 6 - 12 hodin po příhodě, maximum 24 – 48 hodin po příhodě a návrat k původním hodnotám po 4 – 6 dnech
- jaterní onemocnění: (nejčastěji virová hepatitida) - vzestup již v prodromálním stadiu, návrat do 1 – 2 měsíců
- poškození příčně pruhovaného svalstva

De Ritisův kvocient = AST/ALT a může nabývat hodnot >1, <1 nebo =1. U těžkých hepatitid je hodnota kvocientu >1 (nárůst hodnoty díky mitochondriální AST z rozpadu mitochondrií).

15.6.2.3. Gamaglutamyltransferáza

Systematické názvosloví: EC 2.3.2.2; γ -glutamyl-peptid:aminokyselina γ -glutamyltransferáza

Zkratka: GGT, γ -GT, GGTP, GTP, GMT

Dřívější název: gama-glutamyltranspeptidáza.

Povaha molekuly

Glykoprotein, relativní molekulová hmotnost cca 90 000, byl objeven v roce 1950 v ovčích ledvinách

Výskyt v buňce

Mikrosomy

Výskyt v organismu

Ledviny, pankreas, játra (zejména epiteliální výstelka žlučodů)

Tělní tekutiny

- *žluč:* asi 100x vyšší aktivita jak v séru (původ: žlučovody a jaterní buňky)
- *moč:* asi 2 – 6x vyšší aktivita jak v séru (původ: tubulární buňky)
- *sérum:* nízká hladina (původ: játra); pro metody s rozpustným substrátem (viz dále) platí hodnoty pro muže 0,18 – 1,13 $\mu\text{kat/l}$ a pro ženy 0,11 – 0,86 $\mu\text{kat/l}$ (BLT: GMT KIN 100)

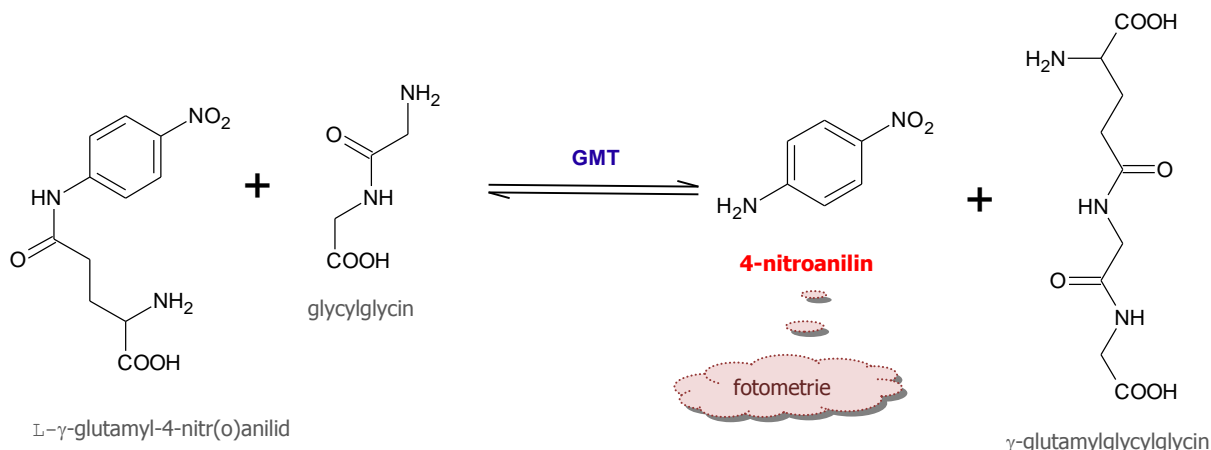
Úloha GGT v organismu

Přenos γ -glutamylového zbytku na vhodný akceptor (viz dále rovnice pro stanovení aktivity GGT).

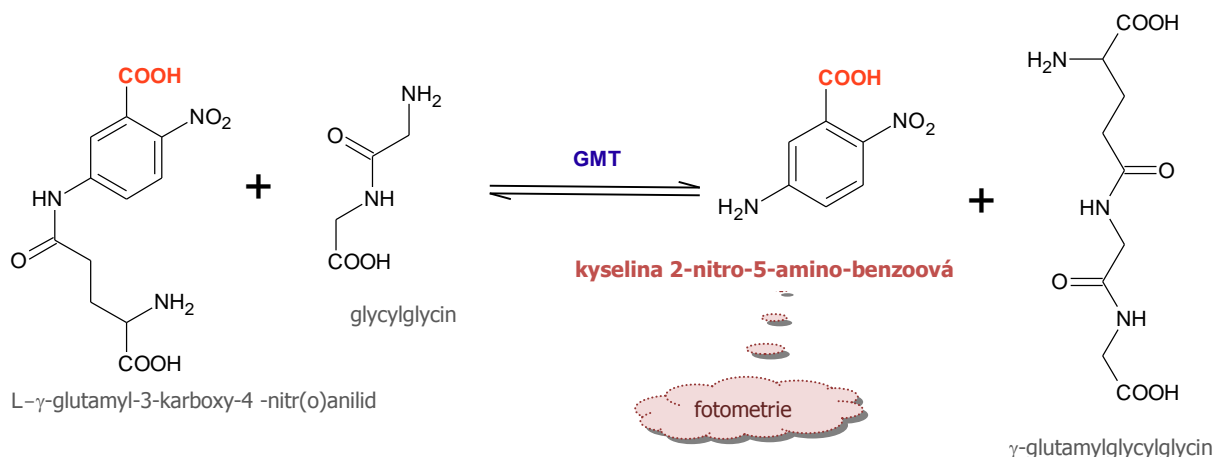
Stanovení aktivity GGT

Metody se substrátem L- γ -glutamyl-4-nitroanilidem

V reakci je použit syntetický substrát L- γ -glutamyl-4-nitroanilid, ze kterého enzym přenáší γ -glutamylový zbytek na glycyglycin, který současně slouží jako pufr; substrát je nutno rozpouštět za tepla a během analýzy udržovat při teplotě alespoň 37 °C, aby nevykrytalizoval



Karboxylovaný substrát je tekutý



Zkráceně:



Karboxylovaný substrát γ -glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilid (doporučen IFCC) je snadno rozpustný ve vodě za laboratorní teploty a umožňuje použití automatického analyzátoru a kinetické měření, což vede ke zcitlivění a zpřesnění metody.

Diagnostická souprava Erba Lachema s.r.o.

GGT 100; substrát γ -glutamyl-4-nitroanilid, rozpouští se 1 min za varu ve vodě, po ochlazení se přidá pufr (glycyglycin); analýza se provádí s kontrolním vzorkem („vlastní slepý vzorek“), který eliminuje žluté zabarvení séra, reakce probíhá při 37 °C a je zastavena zředěnou kyselinou octovou. Fotometrie se provádí v pásmu 400 – 430 nm, metoda je lineární do cca 5 $\mu\text{kat/l}$. Referenční hodnoty v tomto provedení jsou pro muže 0,25 – 1,77 $\mu\text{kat/l}$ a pro ženy 0,17 – 1,10 $\mu\text{kat/l}$

GMT KIN 100, reagentie (pufr + karboxylovaný substrát) se před použitím rozpustí v destilované vodě; fyziologické hodnoty v tomto provedení jsou u mužů 0,17 – 1,10 $\mu\text{kat/l}$ a u žen 0,06 – 0,65 $\mu\text{kat/l}$

GMT L 250, s kapalným karboxylovaným substrátem, referenční hodnoty pro muže 0,18 – 1,02 $\mu\text{kat/l}$ a pro ženy 0,15 – 0,65 $\mu\text{kat/l}$.

Poznámka I: přirozeným substrátem GMT může být např. GLUTATHION, což je γ -glutamylcysteylglucin

Poznámka II: GMT má také izoenzymy, názory na jejich význam se značně rozcházejí – nenašly se specifické změny ve spektru izoenzymů svědčící pro určitý druh onemocnění.

Klinické poznámky**↑ Zvýšení hladiny GGT v séru**

- *jaterní choroby*: jakákoliv porucha buněčné membrány – citlivá, ale málo specifická metoda; nejlepší indikátor jaterních metastáz – dochází k 10 až 20 násobnému zvýšení nad normál
- *žlučové cesty*: obstrukce (překážka v cestě, např. žlučový kámen) – dochází k vysokému nárůstu aktivity, až 6x vyššímu než je nárůst ALP
- *choroby slinivky břišní (pankreatu)*
- *chronický alkoholismus*: mikrosomální hepatální indukce (způsobují i jiné noxy)
- *ledviny*: nádory a záněty

Poznámka: enzym je inhibován oxaláty (šťavelany), citráty (citronany) a fluoridy (antikoagulační činidla)!

15.6.2.4. Kreatinkináza

Systematický název: EC 2.7.3.2; Adenosin trifosfát:kreatin N-fosfotransferáza

Zkratka: CK

Dřívější název a zkratka: Kreatinfosfokináza, CPK

Kinázy jsou enzymy přenášející makroergickou skupinu z ATP na substrát (fosforylace).

Enzym o m_r 81 000, obsahuje dvě aktivní centra, reaktivní SH-skupiny, je to dimerní enzym tvořený dvěma podjednotkami:

- **M** (muscle, *čti más*l, sval) – lokus na chromozomu č. 19
- **B** (brain, *čti brejn*, mozek) – lokus na chromozomu č. 14

Výskyt v buňce

- cytozol
- asociován s myofibrilárními strukturami
- mezi vnější a vnitřní mitochondriální membránou, ale zde je *čtvrtá forma enzymu CK-Mt (čtvrtý izoenzym)*, a např. v srdci představuje zhruba 15% z celkové aktivity CK

Výskyt v organismu

- příčně pruhované svalstvo (nejvyšší aktivita)
- myokard
- mozková kůra
- hladké svalstvo
- štítná žláza
- ledviny
- játra

Hladina v séru

U zdravého jedince je nízká, zvyšuje se *jakýmkoliv* poškozením svalstva (bez ohledu na to, zda jde o příčně pruhované svalstvo či myokard) – např. u degenerativních a zánětlivých onemocnění, ale i vnitrosvalovou injekcí, masáží srdce, fibrilací atd.

Referenční hodnoty (podle Enzymové komise při ČSKB): u mužů do 3,0 μ kat/l a u žen do 2,4 μ kat/l.

Izoenzymy

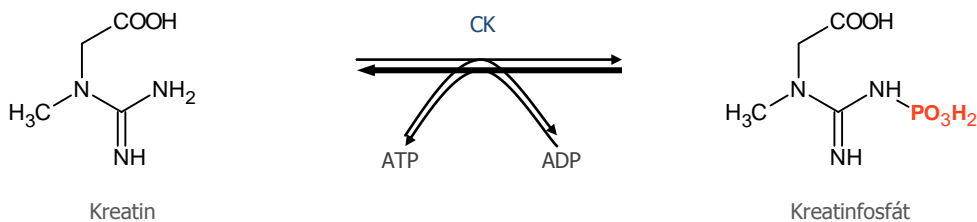
- **MM**; CK-3; (svalový)
- **MB**; CK-2; (myokardiální) – nachází se skoro výhradně jen v myokardu, něco málo v tubulech, v séru je méně jak 5% celkové aktivity,
- **BB**; CK-1; (mozkový)
- **CK-Mt**; vedle forem CK-1 až CK-3 existuje další forma odlišující se od ostatních imunologicky a elektroforetickou pohyblivostí; její struktura je určena lokusem na chromozomu č.15

Makroenzym

makro CK, nachází se u asi 6% hospitalizovaných pacientů, pouze malá část z nich má zvýšené hodnoty aktivity CK. Existuje ve dvou formách, typ 1 a typ 2. Typ jedna je obvykle CK-1 v komplexu s IgG, existují i jiné komplexy, např. CK-3 s IgA. Typ 2 je oligomerní mitochondriální CK. Oba typy jsou tepelně odolné. Oba typy mohou zapříčinit falešně vyšší odečítání CK-2 (CK-MB), pokud byla použita elektroforetická metoda stanovení izoenzymů, případně iontově-výměnná chromatografie nebo metody na bázi imunoinhibice. Typ 1 se vyskytuje u některých chorob (gastrointestinálních, cévních, srdečních, včetně karcinomů) a je spojen s vyšší úmrtností (mortalitou) pacientů.

Úloha CK v organismu

(srovnej s kapitolou věnovanou kreatininu)



Metody stanovení aktivity CK

Barevný test

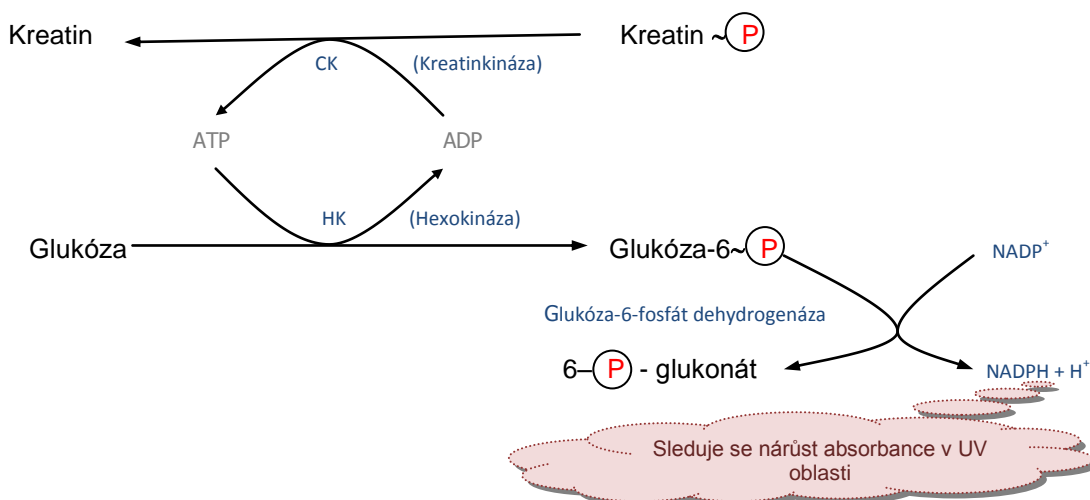
Vychází z úlohy enzymu v organismu (viz rovnice uvedená výš v textu): $\text{kreatin} + \text{ATP} \leftrightarrow \text{kreatin}\sim\text{P} + \text{ADP}$

Je možno stanovit

- *uvolněný kreatin*: dává barevnou reakci s diacetylem a α -naftolem
- *fosfátový anion*: uvolněný hydrolyzou kreatinfosfátu se po deproteinaci stanovuje jako žlutý roztok kyseliny molybdáto-vanadáto-fosforečné

Bývalá diagnostická souprava Lachema Brno: Kreatinkináza

Enzymové stanovení (optický test) využívá těchto reakcí (druhou reakci s glukosou již známe z hexokinázové metody stanovení glukosy, viz kapitola 7, str. 7-4):



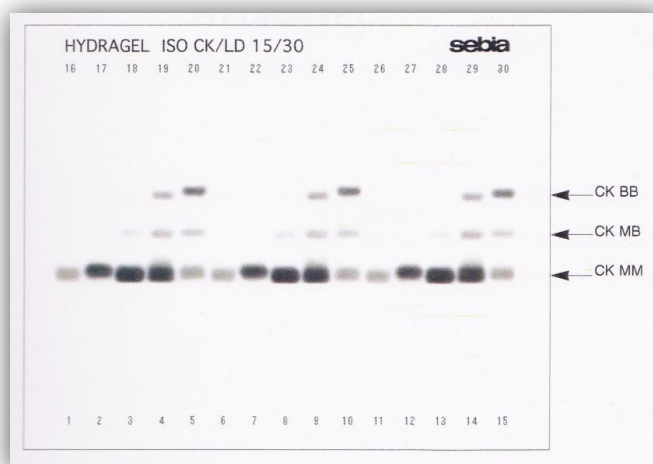
Diagnostické soupravy Erba Lachema s.r.o.

CK NAC L 100, CK NAC L 250, referenční hodnoty muži 0,40 – 3,16 $\mu\text{kat/l}$, ženy 0,40 – 2,83 $\mu\text{kat/l}$

Principy stanovení izoenzymů

- elektroforéza
- ionexová chromatografie
- využití rozdílů v kinetických vlastnostech
- využití různé aktivace SH-skupin
- imunochemické metody
 - imunoprecipitace
 - imunoinhibice
 - stanovení *mass concentration*

Moderní metody stanovení CK-MB (CK-2) jsou založeny na bázi imunochemie (*mass concentration*).



Elektroforeogram izoenzymů CK na agarosových foliích
Hydragel ISO CK/LD 15/30 firmy Sebia

Diagnostická souprava Erba Lachema s.r.o.: Kreatinkinasa MB Liquid 100. Princip reakce je stejný jako u stanovení celkové katalytické koncentrace kreatinkinázy, ale za přítomnosti protilátek proti enzymovým podjednotkám CK-M. Tyto protilátky úplně inhibují aktivitu podjednotek CK-M, ale neovlivňují aktivitu podjednotek CK-B. Určuje se tedy jen katalytická koncentrace podjednotek CK-B. Výpočetní faktor bere zřetel na to, že skutečná aktivita izoenzymu CK-MB je dvakrát vyšší, než aktivita podjednotky CK-B. Referenční hodnoty s tímto setem: do 0,40 $\mu\text{kat/l}$.

Klinické poznámky

↑ Zvýšené hodnoty aktivity CK v séru

Svalová onemocnění: hladina aktivity CK mnohonásobně překračuje aktivity nacházené u infarktu myokardu.

Příkladem (pro zvidavé studenty) svalového onemocnění může být rhabdomyolýza, tj. poškození membrány buněk kosterního svalstva způsobeného výrazným zvýšením koncentrace ionizovaného vápníku a sodíku v buňce. Příčinou tohoto stavu může být vrozená porucha metabolismu (lipidů, svalové glykolýzy aj.), získaná porucha (např. působení léků, drog, imobilita či naopak extrémní svalová aktivita aj.), nebo je příčina neznámá.

Poškození myokardu: nejčastějším případem je infarkt myokardu

Dynamika: 6 hodin po příhodě – začátek nárůstu aktivity CK
24 hodin po příhodě - maximum
3 – 5 dnů po příhodě – návrat na původní hodnoty

V tomto případě je zvýšená aktivita způsobena *zvýšeným množstvím izoenzymu MB (CK-2)*, jehož aktivita se zjišťuje samostatně, případně se zjišťuje jeho „*mass concentration*“. Aktivita CK-MB vyšší jak 6% celkové aktivity CK svědčí pro infarkt myokardu

Onemocnění CNS: dojde-li k poruše cévního aparátu dojde k uvolnění izoenzymu BB (CK-1) a ke zvýšení katalytické koncentrace CK. Tato skutečnost nemá diagnostický význam.

15.6.3. Hydrolázy

Hydrolázy štěpí substrát za přispění vody.

15.6.3.1. Alkalická fosfatáza

Systematický název: EC 3.1.3.1; Fosfohydroláza monoesterů kyseliny orthofosforečné [alkalické optimum]
Zkratka: ALP

Byla objevena v séru v roce 1924. Metaloenzym, jedna molekula obsahuje 4 atomy Zn, rnh 200 – 300 000. Vyskytuje se v několika formách (izoenzymy, izoformy) a celková aktivita představuje součet aktivit všech těchto mnohočetných forem.

Výskyt v buňce: buněčná membrána (viz dále *Výskyt v organismu*)

Výskyt v organismu

Vesmés se jedná o *absorpční* a *sekreční* povrchy: ALP se zúčastní na *aktivním přenosu přes membrány* (hlavně jde o transport lipidů).

- součást buněčných membrán
- kartáčový lem sliznice tenkého střeva; placenta; proximální tubulus (ledvinný)
- povrchová membrána žlučových kanálků, sinusové prostory jater, membrány osteoblastů, epitelie laktující prsní žlázy, granulocytární leukocyty

Hladina v séru

je stabilní, během roku kolísá méně jak o 10%. Cirkulující ALP je zřejmě bez fyziologické funkce. Do moči se vylučuje 1/5 až 1/10 celkové ALP, mezi zvýšením v séru a vylučováním do moče není vztah. Poločas ALP je 3 – 7 dní.

Izoenzymy a izoformy

V současnosti jsou známy čtyři geny, které kódují *izoenzymy* v lidských tkáních. Tyto izoenzymy jsou

- *placentární*, kódovaný genem z placenty
- *střevní*, kódovaný genem z tenkého střeva
- *(3.) izoenzym obsažený v kostech, játrech a ledvinách*, kódovaný tkáňově nespecifickým genem, nacházejícím se v kostech, játrech a ledvinách; tento třetí typ izoenzymu ALP se v různých orgánech liší nestejným obsahem sacharidů v molekule, takže lze dále rozlišit *izoformy* tohoto izoenzymu: kostní, jaterní a enzym z ledvin (v krvi se nevyskytuje). O těchto izoformách se běžně hovoří jako o izoenzimech (izoenzym kostní, střevní).
- *Izoenzymy z varlat, thymu a plic*, kódované genem zárodečných buněk.

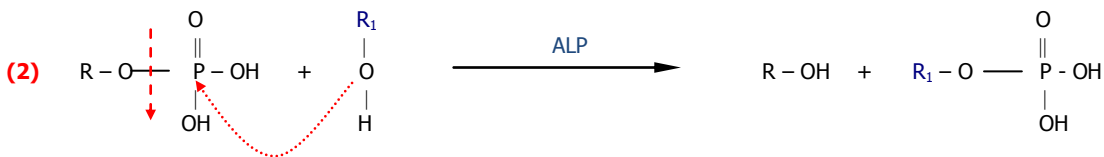
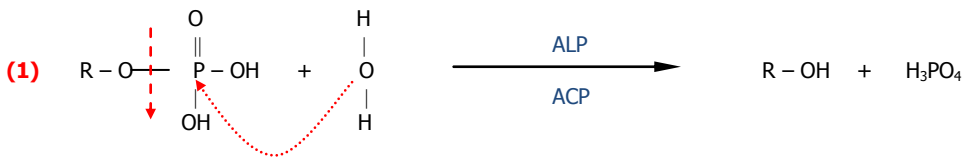
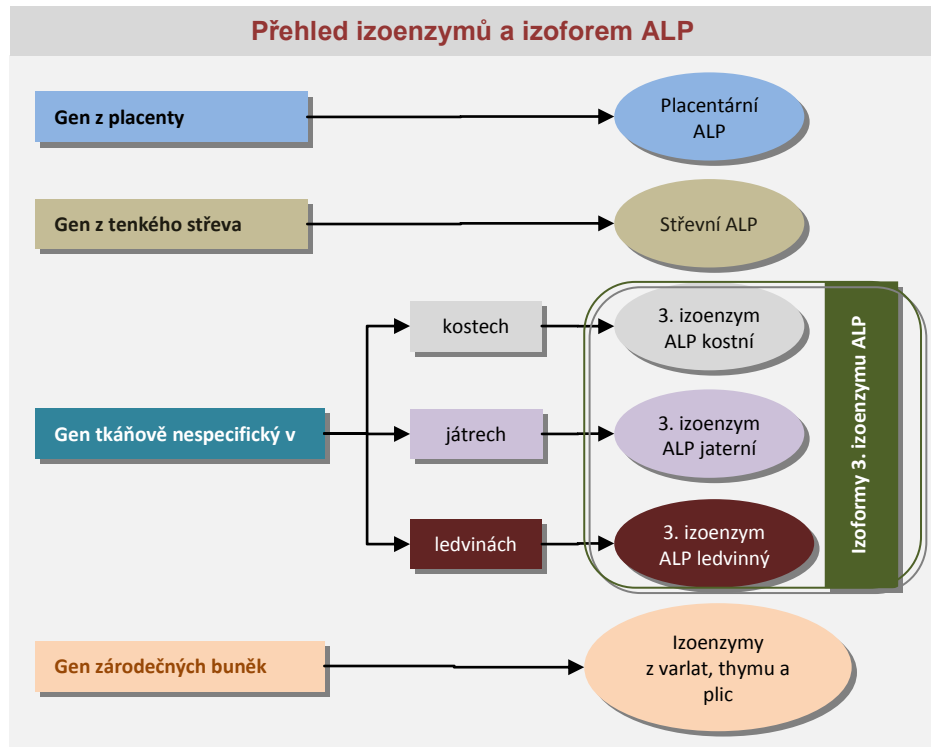
Dále existuje ALP podobná placentárnímu izoenzymu (*placenta-like izoenzym*) produkovaná zejména karcinomy gastrointestinálního ústrojí. Existují i další mnohočetné formy (např. jaterní fosfatázy), komplexy (např. lipoproteinu) s ALP apod. Při izoelektrické fokusaci může být rozlišeno až 17 izoform.

Úloha ALP v organismu

není známa detailně. Především je to lipidový transport ve střevě a kalcifikační proces v kostech.

Enzym katalyzuje hydrolýzu téměř všech typů monoesterů na anorganický fosfát a odpovídající alkohol, fenol, glycid apod.

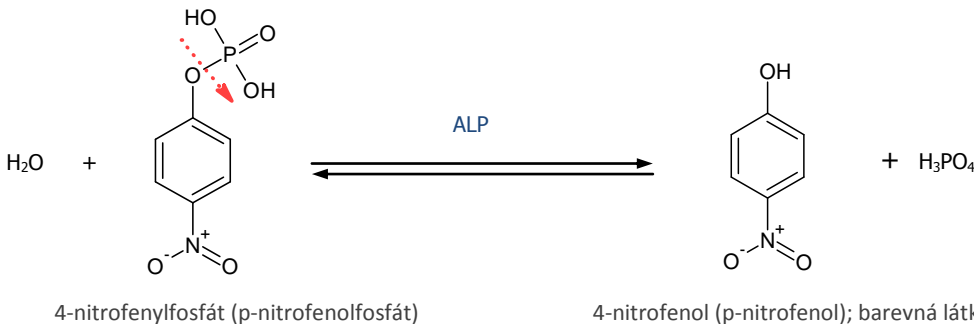
Nehydrolyzuje vazby **P – C**. Přirozený substrát není znám. V případě fosfátových monoesterů katalyzuje hydrolýzu esteru (rovnice 1) i přenos fosfátové skupiny (rovnice 2).



Metody stanovení aktivity ALP

Principy většiny v současnosti používaných metod stanovení aktivity ALP v krevním séru (plazmě) vycházejí z hydrolytického uvolnění fosfátové skupiny [reakce (1)]. Obsahuje-li pufr určité aminoalkoholy, má to vliv na aktivitu enzymu (srovnej dále „hodnoty v séru“). Používají se 2-amino-1-propanol (AMP), diethanolamin (DEA), ehylaminoethanol (EAE), tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) a N-methyl-D-glukamin (MEG, což je čs. patent ing. V. Chromého, Lachema Brno). Zásadní význam pro funkci enzymu mají kationty Zn^{2+} , potencující účinek mají pravděpodobně kationty Mg^{2+} , (vliv efektorů je odvislý od metody). Enzym má pH optimum v alkalické oblasti. Současné doporučení (IFCC) pro stanovení ALP obsahuje 2-amino-1-propanol, tj. AMP.

Princip stanovení:



Pokud se měří manuálně, v konstantním čase, zastaví se reakce inhibitorem, který obsahuje NaOH a EDTA, uvolněný 4-nitrofenol je v alkalickém prostředí žlutý.

Hodnoty v séru**metoda s MEG****metoda s AMP**

Muži:	0,73 – 2,60 μ kat/l	0,67 – 2,15
Ženy:	0,62 – 2,40 μ kat/l	0,58 – 1,74
Děti (chlapci do 14 let, dívky do 12 let)	2,35 – 8,00 μ kat/l	-
Děti (chlapci 13 - 17 let):	-	<6,15
Děti (dívčata 13 – 17 let):	-	<3,11
Novorozenci:	1,90 – 7,00 μ kat/l	<4,17

Poznámka: Hodnoty pro BLT soupravy Erba Lachema s.r.o. (viz dále u metod stanovení) z příbalových letáků souprav.

Diagnostické soupravy Erba Lachema s.r.o.:

Alkalická fosfatasa MEG Liquid 500 (ALP-MEG L 500), používá N-methyl-D-glukaminový pufr (MEG pufr) o pH 10,1, 37 °C, substrátem je 4-nitrofenylfosfát, disodná sůl, fotometrie 405 – 430 nm, doporučeno 420 nm (je potlačena absorbance substrátu).

Alkalická fosfatasa AMP Liquid 500 (ALP-AMP L 500): v současné době je preferováno stanovení optimalizovanou metodou IFCC v 2-amino-2-methyl-1-propanolovém pufru, (tj. v AMP) o pH 10,4, substrát je stejný.

Stanovení izoenzymů ALP

1. Elektroforeticky
2. Inaktivací teplem, či inhibicí 1-fenylalaninem, 1-homoargininem, močovinou, EDTA

Příklad: kostní izoenzym (izoforma 3. izoenzymu) je termolabilní, inaktivuje se 30' zahříváním při 53 °C, 1-fenylalanin inhibuje střevní izoenzym

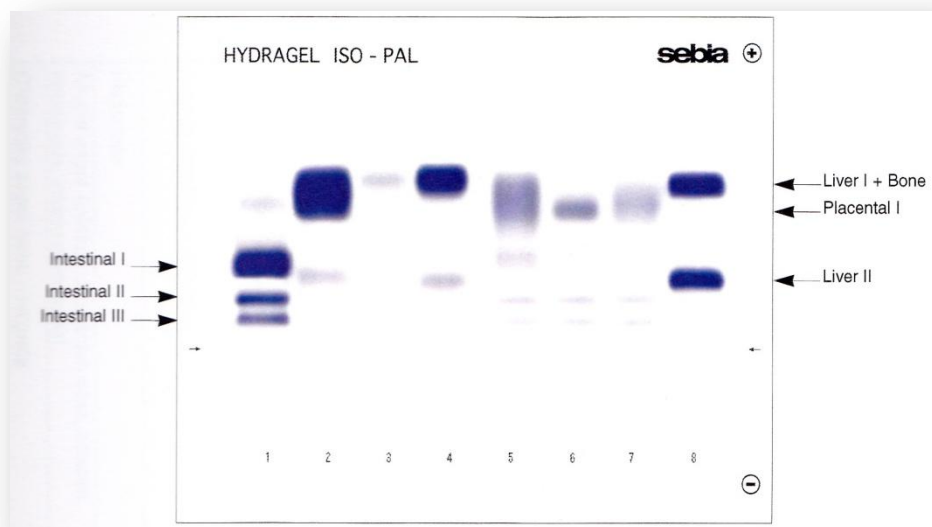
3. Imunochemickými metodami
4. Gelovou chromatografií

Rozlišení izoform ALP je obtížné

Nejčastěji je potřeba odlišit jaterní a kostní izoformu (pro poznání orgánového původu zvýšené ALP v séru) a právě tyto formy jsou si strukturně nejpodobnější.

Kostní ALP se stanoví imunochemicky, využívá se vazba na speciální lektin.

Lektiny – skupina proteinů schopných rozpoznávat a vázat cukry (volné či vázané na glykoproteinech a glykolipidech). Lektiny nemají imunitní původ.



ELFO ALP, agarosový gel, Hydrigel ISO-PAL, firma Sebia
Intestinal = střevní; liver = jaterní; bone = kostní; placental = placentární

Klinické poznámky**↑ Příčiny zvýšené aktivity ALP**

Kostní onemocnění (dochází k nárůstu katalytické koncentrace kostního izoenzymu; zvýšená aktivita ALP je příznakem poruchy růstu (kontrola léčby či indikátor nové ataky), přestavba matrix (u kostních nemocí spojených s přestavbou matrice tudíž dochází vždy k nárůstu aktivity ALP), u dětí v pubertě, osteomalacie, kostní nádory a různé jiné kostní choroby; endokrinopatie; nefropatie.

Choroby jater a žlučových cest – cholestasa, nádorové metastázy v játrech. U necholestatických jaterních onemocněních dochází k typickému nárůstu aktivity \Rightarrow menší diagnostický význam (nutno kombinovat např. s nálezem aktivity GGT).

Vzrůst aktivity není způsoben zvýšením počtu molekul enzymu (zvýšením syntézy jaterního izoenzymu), ale zvýšením katalytické aktivity!

Cholestasa bez mechanické příčiny, cholestasa s intrahepatální mechanickou příčinou (primární biliární cirrhosa, zánět žlučových cest), cholestasa z obstrukce mimojaterních žlučovodů, akutní a chronická hepatitida, steatosa jater, alkohol, toxické poškození jater (jiné než z alkoholu), těhotenská žloutenka, cirrhosa jater (vyskytuje se střevní izoenzym, játra ho neodstraňují).

Střevní onemocnění - poruchy vstřebávání (malabsorpce), celiakie.

Jiná onemocnění - plicní infarkt, krevní choroby (ALP z erytrocytů), degenerativní onemocnění kloubů (hepatotoxické působení léčiv).

Nádory - atypické varianty tvořené nádorovou tkání – různé typy, marker průběhu maligních onemocnění.

↓ Příčiny snížené aktivity ALP

Hypotyreosa (kretenismus), skorbut, nemoc z ozáření, těžké anemie, imunosupresivní léčba, vrozené familiární hypofosfatemie, snížená aktivita kostí, ledvin, jater (vrozené poruchy metabolismu).

15.6.3.2. Kyselá fosfatáza

Systematické názvosloví: EC 3.1.3.2; Fosfohydroláza monoesterů kyseliny orthofosforečné [kyselé optimum]

Zkratka: ACP

Pod názvem *kyselá fosfatáza* se skrývají všechny fosfatázy s optimální aktivitou pod pH 7,0. Název tedy spíše popisuje celou skupinu podobných nebo příbuzných enzymů než jeden zvláštní enzym. Klinicky nejdůležitější je fosfatáza z prostaty, s pH optimem mezi 5 – 6.

Výskyt v buňce

- cytosol: zde se nachází rozpustná, tzv. *erytrocytární ACP*
- lyzomy: obsahují nerozpustné, tzv. *tkáňové ACP*

Výskyt v organismu

erytrocyty, kosterní a srdeční sval, prostata, placenta, ledviny, játra, slezina, plíce, mozek, fibroblasty, leukocyty, lymfocyty

Isoenzymy

- *cytosolová*, tzv. erytrocytární ACP (nachází se i v jiných tkáních, v erytrocytech je jí nejvíce): rozpustná ACP, má gen na krátkém raménku chromosomu č. 2, lokus je polyalelický
- *lyzomální*, tzv. tkáňové ACP, mají lokusy na chromosomu č. 11, lze rozlišit pět izoenzymů tkáňových fosfatáz, značených písmeny A, B, C, D a F. Fosfatázy z různých orgánů dávají při elektroforetickém dělení různé obrazce, s typickým zastoupením těchto izoenzymů.

Příklad: Placentární fosfatáza se dělí (od katody k anodě) na izoenzymy C, B a A, fosfatáza z lymfocytů na dva izoenzymy D a A, plicní na C a A, fosfatázy z polymorfonukleárních lymfocytů na izoenzymy A a F (F je nejrychleji putující izoenzym, tj. putuje k anodě ještě rychleji než A)

Ze tkáňových fosfatáz má diagnosticky největší význam prostatický izoenzym, kterého se využívá k diagnóze velkých karcinomů¹⁾ prostaty a ke sledování průběhu karcinomu prostaty. Prostatický izoenzym je inhibován vínanem (tartarátém).

¹⁾Při karcinomu prostaty se zvyšuje uvolňování tohoto enzymu do oběhu, ale v plazmě se nacházejí nízkomolekulární inhibitory prostatického izoenzymu, takže celková aktivita ACP a ACP-P se zvyšuje až po generalizování nádoru nebo jeho metastazování.

Stanovení aktivity ACP

Kyselá fosfatázy jsou nestabilní, především při teplotách nad 37 °C a při pH nad 7,0. Některé z forem enzymu přítomných v séru, zvl. prostatický enzym, jsou obzvláště labilní a při pokojové teplotě může být během 1 hodiny ztraceno až 50% původní aktivity ACP přítomné ve vzorku. Doporučuje se vzorek okyselit (např. citrananem sodným) na pH pod 6,5.

Princip stanovení je stejný jako u ALP (viz tam), může být použit i stejný substrát, ale jiný pufr o pH cca 5.

Stanovení aktivity prostatického izoenzymu

V jednom vzorku se stanoví celková aktivita ACP, ve druhém vzorku stejného pacienta se stanoví aktivita ACP za přítomnosti vínanu (tj. aktivita neprostatické formy).

Výpočet: prostatická forma (ACPP, PACP) = celková aktivita – aktivita v přítomnosti vínanu

Bývalé diagnostické soupravy PLIVA - Lachema Diagnostica:

- **Kyselá/prostatická/ fosfatasa 90 [ACP/ACP-P 9x10]**, kinetické stanovení s 1-naftylfosfátem jako substrátem: odštěpený 1-naftol reaguje s *Fast Red TR* na žluté azobarvivo vhodné k fotometrii, sleduje se přírůstek absorbance za čas); inhibice prostatické formy vlnanem; pH pufru 5,0; fotometrie při 405 nm; reakční směs obsahuje 1,5-pentadiol, který urychluje reakci
Referenční intervaly: muži do 108 nkat/l; ženy do 83 nkat/l; ACP-P do 43 nkat/l
- **Kyselá fosfatasa ACT [ACP 60]**, kinetické stanovení s 4-nitrofenylfosfátem a aktivátory prostatického isoenzymu, fotometrie při 405 – 420 nm

Klinické poznámky**↑ Zvýšení aktivity v séru**

Karcinom prostaty (zvyšuje se zvl. aktivita prostatické formy), hematologické choroby, Pagetova choroba, hyperparathyreoidismus s ovlivněním skeletu, kostní nádory a metastasy nádorů do kostí.

15.6.3.3. Alfa-amyláza

Název	Systematický název	Alternativní názvy
α-amyláza	E.C. 3.2.1.1; 1,4-α-D-glukan-glukanhydroláza	Glykogenáza
β-amyláza	E.C. 3.2.1.2; 1,4-α-D-glukan-maltohydroláza	Glykogenáza Sacharogenní amyláza
γ-amyláza	E.C. 3.2.1.3; 1,4-α-D-glukan-glukosidáza	Glukoamyláza Lyzosomální alfa-glukosidáza

Zkratka pro alfa-amylázu: AMS

Amylázy jsou hydrolázy, štěpí škrob a glykogen na maltosové jednotky, případně až na glukosu.

- β-amyláza: nachází se v rostlinné říši
- γ-amyláza: kyselá a neutrální, játra, sliznice tenkého střeva, exoamyláza, tzn., že štěpí glykogen na glukosu
- α-amyláza: M_r cca 60 000, biologický poločas 2 hod, sekreční enzym, pouze asi 1% celkového množství se vylučuje do krevního oběhu; část enzymu se vylučuje močí přes bazální membránu, což umožňuje jeho relativně nízká molekulová hmotnost

Výskyt α-AMS v organismu

Amyláza je produkována žlázami gastrointestinálního ústrojí

- slinnými žlázami
- slinivkou břišní (pankreas)
- a v menší míře i jinými orgány (játry, vaječníky, prsní žláza).

Izoenzymy

přesněji se jedná o *izoformy* AMS – slinnou (S) a pankreatickou (P) amylázu – které se od sebe liší cukernou složkou.

Význam stanovení izoenzymů/izoforem

- zdraví lidé mají aktivitu obou izoenzymů/izoforem (S a P) zhruba stejnou
- *akutní pankreatitida*: P-amyláza tvoří až 90% celkové aktivity AMS, jeho aktivita je zvýšena, i když celková aktivita je v mezích normy
- *chronická pankreatitida*: snížená aktivita P-amylázy (nedostatečnost – insuficience - slinivky břišní)
- *parotitida*: zvýšená aktivita S-izoenzymu

Úloha α-AMS v organismu

Amyláza štěpí polysacharidy na oligosacharidy se 6 – 7 glukosovými jednotkami a dále na disacharidy – maltosu a isomaltosu; maltosa je dále maltasou (α-D-glukosidáza) štěpena na glukosu, isomaltosa je štěpena amylázou na glukosu; je to *endoamyláza*, tzn., že štěpí polysacharidy od středu molekuly

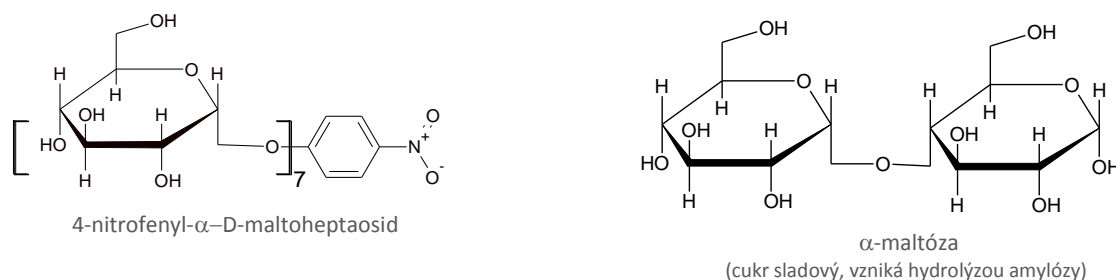
Metody stanovení α-AMS**Metody se substrátem na bázi škrobu**

- *Sacharogenní metody*: substrátem je přirozený škrob, po jeho štěpení se stanovují štěpné produkty = redukcující cukry
- *Amyloklastické metody*: štěpením se mění optické vlastnosti škrobu, což lze sledovat turbidimetricky, nefelometricky, případně se využívá barvitelnosti škrobu jódem
- *Chromogenní metody*: substrátem je syntetický škrob s navázaným barvivem, které se při štěpení škrobu enzymem uvolňuje a přechází do roztoku, jeho koncentrace je úměrná aktivitě enzymu

Bývalý Spofa-test alfa-Amyláza: umělý škrob obsahoval remazolovou brilantní modř, reakce probíhala při 37 °C po dobu 15 minut, výsledky se odečítaly z tabulky přiložené ke každé šarži testu. Referenční hodnoty touto metodou: krev 1,2 – 5,0 $\mu\text{kat/l}$; moč 2,7 – 33,3 $\mu\text{kat/l}$. Tato metoda byla až donedávna velmi rozšířena v klinicko-biochemických laboratořích. Předchůdcem byl švédský *Phadebas alfa-amyláza* – dával vyšší výsledky, protože zde reaguje i γ -amyláza.

Metody tohoto typu jsou již opuštěny a nahrazeny metodami s definovaným (kapalným) substrátem. Vycházejí z poznatku, že hydrolyza malých oligosacharidů katalyzovaná α -amylázou dává lépe definované produkty než hydrolyza škrobu.

4-nitrofenyl-glykosidové substráty: příkladem substrátu může být 4-nitrofenyl- α -D-hepta (1 \rightarrow 4) glukopyranosid \equiv 4-nitrofenyl- α -D-maltoheptaosid



Existuje několik substrátů lišících se jednak počtem glukosových zbytků (tri- až heptaosidy, tj. index vpravo dole u závorky = 3 – 7, jednak blokující skupinou, či indikační skupinou. Blokující skupiny (EPS = Ethylidene Protected Substrates, tj. substráty chráněné ethylenem, blokující skupinou je ethylen; blokující skupinou může být i oxobutylen aj.) jsou kovalentně navázány na neredukující konec molekuly a brání pomalé hydrolyze substrátu způsobené ve vzorku přítomnou α -glukosidasou, čili zvyšují stabilitu substrátu. Některé nevýhody 4-nitrofenolu (4-NP) jako indikační skupiny odstraňuje použití β -2-chloro-4-nitrofenolu (CNP). V praxi se lze setkat s různými zkratkami substrátů – např. 4-NP-G7 (pro molekulu uvedenou ve vzorci výš), CNP-G7 (heptaosid s indikační skupinou CNP) atd., kde

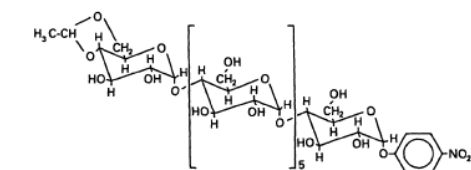
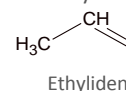


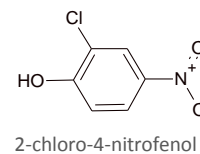
Fig. 1. 4,6-Ethylidene-(G₇)-1-4-nitrophenyl-(G₁)- α -D-maltoheptaoside (M, 1300)

GX označuje počet glukosových zbytků v oligosacharidu, dále jsou uvedeny blokující, příp. indikační skupiny. Na obrázku vlevo je uveden EPS-4-NP-G7 (*Ethylen-4-nitrofenyl-maltoheptaosid*).

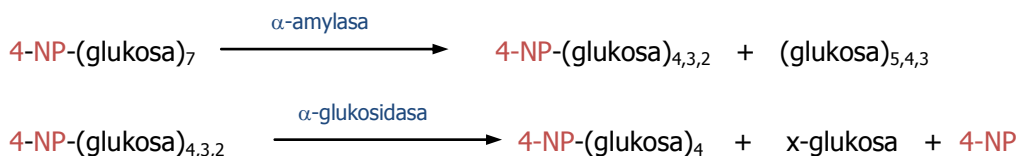
Uvedené substráty jsou rozpustné a lze je snadno použít v automatických analyzátořech.

Metody s těmito substráty se v rutinních klinicko-biochemických laboratořích v současné době užívají prakticky výhradně.

Horní hranice normálních hodnot s těmito substráty jsou v séru přibližně 1,5 $\mu\text{kat/l}$ a v moči 8,2 $\mu\text{kat/l}$.



Reakce probíhá podle následujícího schématu



Nárůst uvolněného nitrofenolu (4-NP) lze sledovat fotometricky (kinetická metoda).

Diagnostické soupravy Erba Lachema s.r.o.: alfa-Amylaza Liquid 100 (AMS L 100), alfa-Amylaza Liquid 250 (AMS L 250). Substrátem je 4,6-ethyliden-4-nitrofenyl- α -D-maltoheptaosid.

Jiné definované substráty

- v analyzátoru *aca* firmy Du Pont je hydrolyzována maltopentaosa postupně až na glukosu, která reaguje s ATP s využitím hexokinázového systému (viz stanovení glukosy), tzn., že kinetika reakce je sledována optickým testem (NAD/NADH)
- metoda Beckman DS používá jako substrát maltotetraosu ze které vzniká sledem reakcí glukosa-6-P, který je pomocí glukosa-6-P-dehydrogenasy (G6PD) dehydrogenován na 6-P-glukonolakton; koenzymem G6PD je NAD, tedy i zde je využito optického testu (NAD/NADH)

Klinické poznámky

↑ Příčiny zvýšení aktivity v séru

- Poškození produkujících žláz a vyplavení enzymu do krve (v moči se zvýší aktivita enzymu o několik hodin později)
- Onemocnění slinných žláz (parotitida, sialolitíáza, trauma, nádor)
- Onemocnění pankreatu (akutní pankreatitida, penetrující žaludeční vřed, přetlak ve žlučových cestách při biliární kolice či po podání opiátů, úraz nebo operace pankreatu)

Snížené vylučování amylázy ledvinami (v séru je zvýšená aktivita AMS, v moči snížená)

- Renální insuficience (snížená glomerulární filtrace - potvrdí např. clearance endogenního kreatininu)
- Makroamylazemie – enzym je vázán na IgG či IgA a v krvi se hromadí vzniklý makromolekulární komplex, který nemůže projít glomerulem; bývá u nádorů.

15.6.3.4. Cholinesteráza

Název	Systematický název	Alternativní názvy
Acetylcholinesteráza	EC 3.1.1.7. Acetylcholin acetylhydroláza	„Pravá“ cholinesteráza Cholinesteráza I
Acylcholinesteráza	EC 3.1.1.8. Acylcholin acylhydroláza	Benzoylcholinesteráza Cholinesteráza II

Zkratky pro (*acyl*)cholinesterázu: CHS, CHE, ChE, SChE

Jak vidno, je třeba rozlišovat **dva podobné enzymy**. Oba (podobné) enzymy mají schopnost hydrolyzovat acetylcholin, liší se však v substrátové specifitě i v citlivosti k inhibitorům.

Acetylcholinesteráza hydrolyzuje pouze estery cholinu (nazývá se proto též *specifická cholinesteráza*), neatakuje arylestery a alkylestery. Tento enzym štěpí acetylcholin uvolněný z nervových zakončení na cholin a acetát a ovlivňuje tak přenos nervového impulsu přes synapsi ke koncovému orgánu (*viz dále „Úloha acetylcholinesterázy v organismu“*).

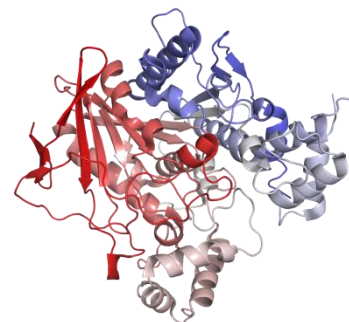
Acylcholinesteráza, kromě acetylcholinových esterů reaguje i s estery benzoylcholinu, butyrylthiocholinu a s arylestery a alkylestery (nazývá se proto též *nespecifická cholinesteráza*).

Oba enzymy jsou inhibovány některými alkaloidy obsahujícími kvartérní dusík (kompetitivní inhibice) a irreverzibilně některými organofosfáty (mj. se jedná o postřiky proti hmyzu, bojové látky sarin, tabun = nervové jedy, intoxikace může skončit smrtí), dále mnoha jinými látkami, jako jsou morfin, chinin, terciární aminy, fenothiaziny, pyrofosfáty, soli žlučových kyselin, citronany, fluoridy a boráty.

Výskyt cholinesterázy v organismu

Acetylcholinesteráza: erythrocyty, plíce, slezina, šedá kůra mozková, nervová zakončení. **Nenachází se (volná) v plazmě.**

Acylcholinesteráza: prakticky všechny buňky, kromě erythrocytů; játra (zde se syntetizuje v ribozomech hepatocytu paralelně s albuminem, syntéza těchto proteinů je však vzájemně nezávislá), střevní sliznice, pankreas, srdce, bílá mozková hmota, *krvní sérum/plazma*. Je nutno si uvědomit, že „sérová cholinesteráza“ = pseudocholinesteráza! V moči se nenachází. Acylcholinesteráza je tetramerní enzym tvořený dvěma dimery; má celkovou molekulovou hmotnost 348 000. Na každé ze čtyř identických podjednotek se nachází aktivní centrum. Obsahuje sacharidové řetězce. Elektroforeticky lze rozdělit na více frakcí (7-12), jedná se pravděpodobně o agregáty složené z různého množství stejného základního enzymu. Biologický poločas je 10 dní.



Acylcholinesteráza

Isoenzymy (*genetické varianty, alelozymy*)

Syntéza sérové cholinesterázy je kontrolována genem na lokusu E₁, který se nachází na dlouhém raménku chromosomu č. 3. Existuje několik alel, známy jsou alely značené U, A, S, F, H, J, K, které jsou zodpovědné za syntézu zhruba 28 různých fenotypů. Někteří jedinci mají na zmiňovaném genu více než jednu mutaci, takže ne vždy odpovídá fenotyp genotypu. Některé tyto varianty cholinesterázy (isoenzymy, alelozymy) mají sníženou plazmatickou aktivitu a

nehydrolyzují *sukcinylocholin* a jsou příčinou *prodloužené zástavy dechu při chirurgických zákrocích s použitím myorelaxancií sukcinylocholinového typu*. (Sukcinylocholin inhibuje acetylcholinesterázu, nervový mediátor, za normálních okolností je však rychle rozložen pseudocholinesterázou, což se neděje v případě zmiňovaných variant ChE). Z klinického hlediska je důležité v těchto případech vědět jaký typ ChE pacient má. Biochemicky lze typ ChE určit podle její *citlivosti k inhibitoru dibucainu* (lokální anestetikum) nebo *fluoridu* či inhibitoru značeného *Ro 2-0683*, kdy *normální ChE je inhibována ve vyšší míře než atypické formy* (atypické formy jsou vůči těmto inhibitorům odolnější než normální ChE).

Pro zvědavé studenty

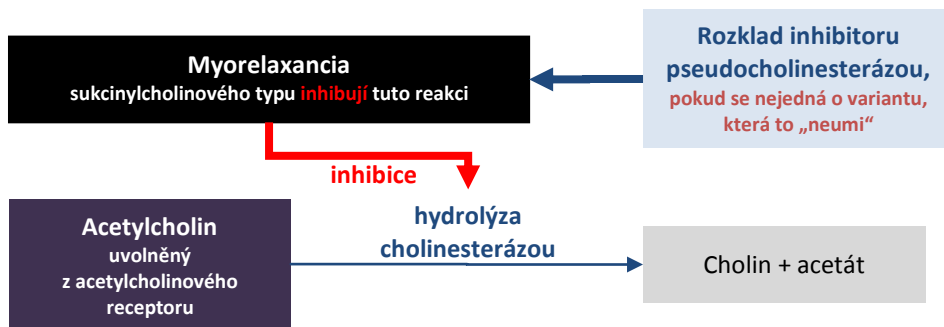
Normální aktivitu v séru má produkt genu/alely **U** (usually), tj. E_1^U v homozygotní formě ($E_1^U E_1^U$). Více než 70% aktivity této formy cholinesterázy je inhibováno dibucainem. [V tabulce vpravo níž zelené pole]. Další tři varianty alely (A, S, F) produkují cholinesterázu s pozměněnou katalytickou aktivitou.

Atypický gen A (atypical; E_1^A) ovládá syntézu cholinesterázy se *sníženou aktivitou* v séru a *zvýšenou odolností vůči dibucainu* (zejména v homozygotní formě $E_1^A E_1^A$; u bílé populace se této formy, podobně jako formy $E_1^F E_1^F$, nachází pouze 0,3 – 0,5 %). Dibucainem je inhibováno méně než 30% aktivity tohoto enzymu.

Označení **F (fluoride resistant; E_1^F)** nese alela, jejíž produkt, cholinesteráza, je *odolný vůči inhibici fluoridem*, ale je významně inhibován dibucainem.

Tzv. „**tichý**“ gen označený **S** (E_1^S) produkuje cholinesterázu *neschopnou hydrolyzovat vazby cholinových esterů*. Kombinací těchto čtyř alelických genů lze získat jednu normální a devět atypických variant cholinesterázy. [V tabulce vpravo růžové pole].

Tři další varianty genů, alely **J, K a H** mají sice zakódovaný enzym s *normální aktivitou*, ale díky nestabilitě enzymu či nedostatečné syntéze se v plazmě nachází poměrně *málo molekul enzymu*, tudíž výsledná enzymová aktivita je *snížena*, a to u varianty **K** o 33% proti běžným hodnotám, u varianty **J** o 66% a u varianty **H** dokonce o 90%. [Kombinace K a H s A a U v tabulce vpravo šedé pole].



Některé genotypy ChE

1	E_1^U	E_1^U
2	E_1^U	E_1^A
3	E_1^U	E_1^F
4	E_1^U	E_1^S
5	E_1^A	E_1^F
6	E_1^F	E_1^F
7	E_1^F	E_1^S
8	E_1^A	E_1^A
9	E_1^A	E_1^S
10	E_1^S	E_1^S
11	E_1^A	E_1^K
12	E_1^U	E_1^K
13	E_1^U	E_1^H
14	E_1^A	E_1^H

Aby cholinergní neuron mohl obdržet další impuls, musí se acetylcholin z příslušného receptoru uvolnit, což je možné tehdy, je-li koncentrace acetylcholinu v okolí receptoru dostatečně nízká. Uvolněný acetylcholin musí být proto bezprostředně po uvolnění rozložen, což se děje za přispění acetylcholinesterázy. Pokud je tato inhibovaná (např. myorelaxancií sukcinylocholinového typu) přestanou se přenášet nervové vzruchy. Za normálních okolností je zmíněný inhibitor rozložen acylcholinesterázou. Pokud však jedinec disponuje variantní acylcholinesterázou, která zmiňovanou látku (inhibitor) nerozloží, nebo ji alespoň nerozloží dostatečně rychle, je rozklad acetylcholinu blokována a nervové impulsy se nepřenášejí.

Klasickou metodou biochemické genotypizace plazmatické CHE je využití inhibičních testů s *dibucainem* (10^{-5} mol/l) a/nebo s *fluoridem* ($5 \cdot 10^{-5}$ mol/l NaF). Rozlišovacím kritériem je tzv. **Dibucainové číslo D**, definované :

A_i = aktivita enzymu inhibovaného dibucainem
 A_{ni} = aktivita neinhibovaného enzymu

$$D = 1 - \frac{A_i}{A_{ni}}$$

Hodnocení nálezu	Dibucainové číslo [D]
Normální nález	0,9 – 0,6
Heterozygotní atypická CHE	0,6 – 0,3
Homozygotní atypická CHE	< 0,3

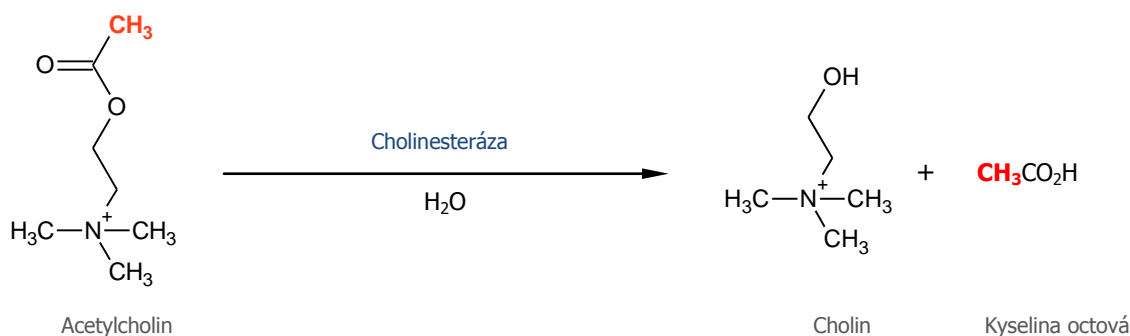
Některé prameny uvádějí mírně odlišné hodnocení:

$D > 0,7$ = homozygotní forma normální CHE
 $D = (0,7 - 0,4)$ = heterozygotní forma CHE
 $D < 0,3$ = homozygotní forma atypické varianty CHE

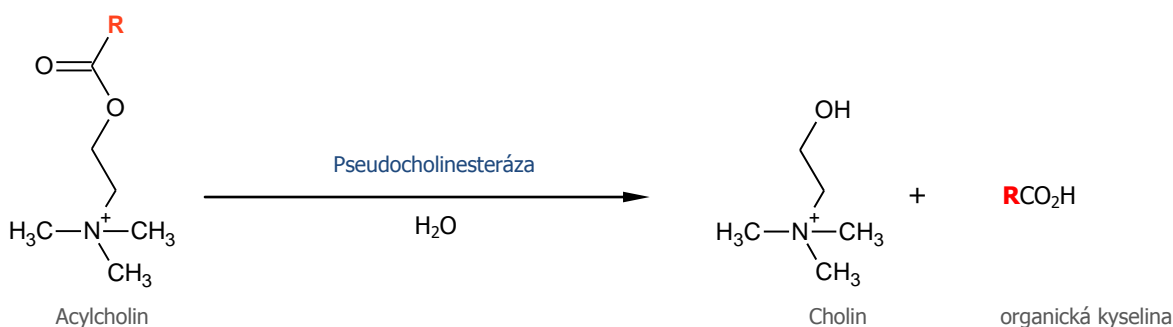
Fluoridové číslo: postupuje se obdobně jak u dibucainu, do reakční směsi se přidává fluorid o koncentraci 5×10^{-5} mol/l
Ro 2-0683 číslo: Ro 2-0683 je specifitější inhibitor než dibucain, který prakticky kompletně inhibuje normální CHE (E_1^U), zatímco atypickou variantu (E_1^A) prakticky neinhibuje

Acetylcholinesteráza je potřebná pro přenos nervového signálu

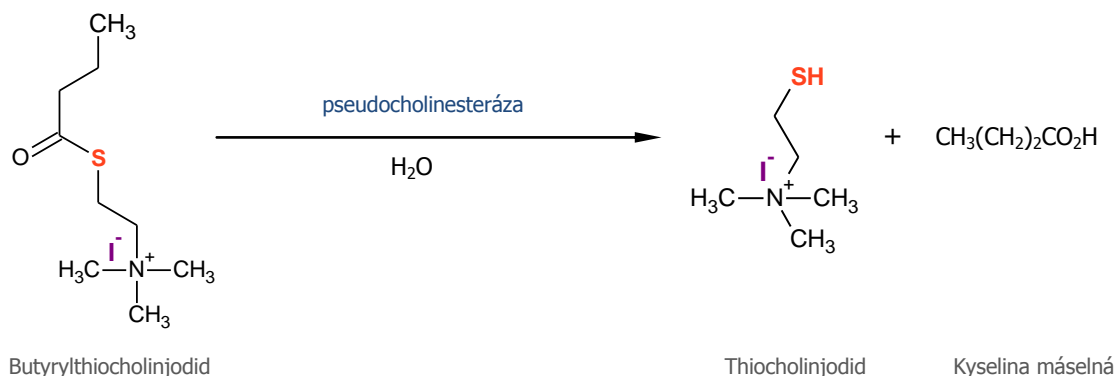
Degradace acetylcholinu uvolněného v nervovém zakončení. Je to reakce nutná pro přenos nervového signálu.

**Úloha acylcholinesterázy v organismu je neznámá.**

Enzym hydrolyzuje estery podle následující rovnice



Jak bylo uvedeno výš, enzym je schopen hydrolyzovat i jiné estery, než estery cholinu.

Metody stanovení aktivity acylcholinesterázy

hiochinolinový ion + DTNB (bezbarvá) = směsný disulfid + 5-MNBA (barevná)

Cholinesteráza štěpí butyrylthiocholiniodid na kyselinu máselnou a thiocholin. Ten reaguje s bezbarvou kyselinou di-thio-bis-nitrobenzovou (DTNB) na tzv. *směsný disulfid* a na *kyselinu 5-merkpto-2-nitrobenzovou* (5-MNBA), která je barevná a fotometrovatelná při 410 nm. Používají se i jiné chromogeny (např. dithiopyridin).

Diagnostická souprava Erba Lachema s.r.o.

Cholinesterase (CHE 50). Substrátem je butyrylthiocholiniodid a chromogenem DTNB, referenční hodnoty 76 – 230 $\mu\text{kat/l}$.

Klinické poznámky

CHE je *mírou syntetické schopnosti jater*, funkčního jaterního parenchymu. Výhodné je sledování v čase.

↓ **Příčiny snížení aktivity ChE v séru:** hepatitida, cirrhosa, jaterní metastázy, malnutriční stavy (současně dochází i ke snížené syntéze albuminu), intoxikace karbamáty a organofosfáty (viz kapitola *Toxikologie*), inhibice farmakoterapií (neostigmin, cyklofosamid, metotrexát; orální kontraceptiva s ethinylestradiolem)

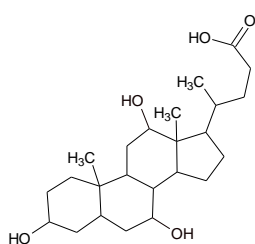
↑ **Příčiny zvýšení aktivity ChE v séru:** obezita, nefróza (vzrůst proteinové syntézy pro kompenzaci ztrát albuminu vede ke vzrůstu obsahu cholinesterázy, která se neztrácí ledvinami)

15.6.3.5. Lipáza

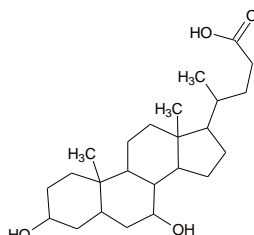
Systematické názvosloví: EC 3.1.1.3.: Triacylglycerol acylhydroláza;

Zkratka: LPS

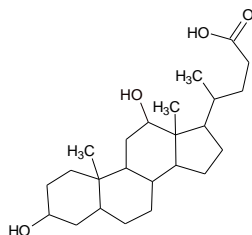
Lidská lipáza je glykoprotein o molekulové hmotnosti 48 000, s isoelektrickým bodem kolem 5,8. Pro plnou katalytickou aktivitu a nejvyšší specifitu vyžaduje přítomnost *žlučových solí* (solí žlučových kyselin) a kofaktor, tzv. *kolipázu*. Kolipáza je peptid o 95 aminokyselinách. Sama o sobě nemá enzymovou aktivitu. Lipázu je možno aktivovat i *in vitro* kolipázou z jiných druhů (např. kolipázou z prasat), čehož se využívá v dg soupravách pro stanovení lipázy.

Žlučové kyseliny

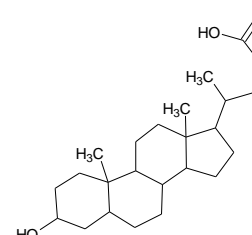
Kyselina cholová



Kyselina chenodeoxycholová



Kyselina deoxycholová



Kyselina lithocholová

Výskyt lipázy v organismu

Lipáza a kolipáza jsou syntetizovány v *acinárních* (= nacházející se v lalůčcích žlázy) pankreatických buňkách a jsou vylučovány pankreatem ve zhruba ekvimolárních množstvích kolem 10 $\mu\text{mol/l}$ (kolipáza je vylučována ve formě neaktivní *prokolipázy*, peptidu složeného ze 101 aminokyselin, je aktivována trypsinem, který z ní odštěpuje hexapeptid *enterostatin*, výrazně inhibující příjem tuků). Tento vzájemný poměr se udržuje i v séru, i když menší molekulová hmotnost kolipázy (cca 11 000) umožňuje, aby byla vylučována ledvinami. Obtíže nastávají při akutním zánětu pankreatu, kdy dochází k poklesu poměru kolipáza/lipáza a je prakticky nemožné stanovit skutečnou aktivitu lipázy. Většina lipázové aktivity v séru má zdroj ve slinivce, menší část pochází z lipázy produkované v podjazykových žlázách a v žaludeční, plicní a střevní mukóze; lipázovou aktivitu lze zjistit i v leukocytech, v tukových tkáňových buňkách, v mléku.

Isoenzymy a isoformy

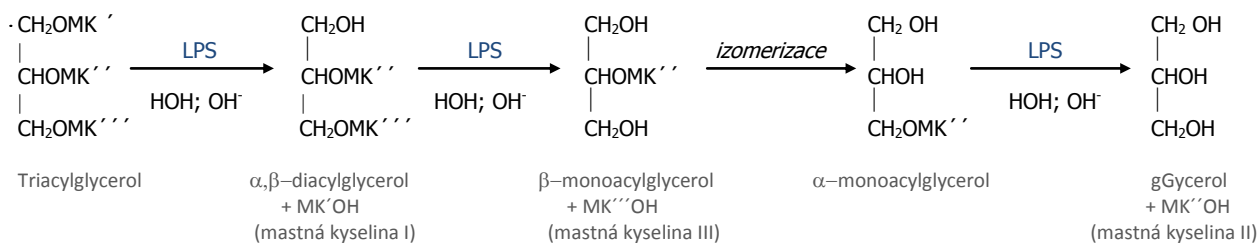
Lipáza může prostupovat glomerulem, ale v tubulech je totálně reabsorbována, tudíž v moči není normálně detekována. Protože však v některých případech tomu tak není, soudí se, že lipáza existuje minimálně ve dvou isoformách, jejich podstata však není známa. Jedna isoforma označená L-2 byla nalezena ve všech sérech pacientů s akutní pankreatitidou, byla však nalezena i u některých pacientů s chorobami, které nesouvisely se slinivkou břišní.

Hodnoty v séru se liší podle použité metody stanovení

Acidimetrie	s olivovým olejem jako standardem	0,5 – 3,9 $\mu\text{kat/l}$
	s trioleinem jako standardem	0,6 – 4,3 $\mu\text{kat/l}$
Turbidimetrie		0,5 – 3,2 $\mu\text{kat/l}$
Enzymové metody	<i>Reagents Applications</i>	0,12– 1,0 $\mu\text{kat/l}$
	<i>Wako</i>	0,17- 1,0 $\mu\text{kat/l}$
	<i>Sentinel</i>	$\leq 0,5 \mu\text{kat/l}$

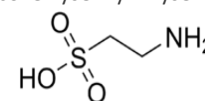
Reagents Applications, Wako a Sentinel jsou názvy firem vyrábějících/dodávajících příslušné reagentie.

Lipáza hydrolyzuje triacylglyceroly podle následující rovnice:



Poznámky k průběhu reakce pro zvědavé studenty:

- Lipáza zprvu hydrolyticky štěpí pouze esterové vazby mastných kyselin (MK) na krajních uhlících (α -poloha), tj. na uhlících 1 a 3. Esterová vazba na uhlíku č. 2 (β -poloha) zřejmě kvůli sterickým zábranám atakovaná není. V první fázi se tak z jednoho molu substrátu uvolní 2 moly mastných kyselin a jeden mol β -monoglyceridu. Tento monoglycerid sice vzdoruje hydrolyze lipázou, ale dochází ke spontánní izomeraci na α -formu (3-acylglycerol) a rovněž třetí mastná kyselina je nakonec lipázou odštěpena, i když mnohem pomaleji
- Lipáza působí pouze ve vrstvě mezi vodou a substrátem, tzn., že substrát musí být v emulgované formě, rychlost reakce přitom závisí na velikosti povrchu emulgovaného substrátu: (zde se uplatňuje emulgační schopnost žlučových solí, tj. sodných a draselných solí žlučových kyselin; tyto soli jsou konjugovány s glycinem nebo taurinem; primární žlučové kyseliny = kyselina cholová a chenodeoxycholová, vznikají přeměnou cholesterolu; sekundární žlučové kyseliny = kyselina deoxycholová a lithocholová, vznikají z primárních žlučových kyselin bakteriální přeměnou ve střevě); povrch substrátu musí být přítom bez dalších proteinů včetně lipolytických enzymů (tj. lipoproteinové lipázy)
- Kolipáza se uplatňuje tak, že se spojí se žlučovými kyselinami do komplexu, který se připojí na povrch substrátu. Toto uskupení váže s vysokou afinitou lipázu a umožňuje tak lipáze činnost. Je to umožněno tím, že kolipáza má tvar plochého čtyřúhelníku, přičemž jedna strana je hydrofobní a druhá strana je hydrofilní. Může se tak stát součástí obalu micely a spojit oba "protichůdné světy".



Taurin
(kyselina
aminoethansulfonová)

Metody stanovení katalytické koncentrace lipázy

Titrační metody

Směs triacylglycerolů je hydrolyzována lipázou ve zkoumaném vzorku a po určité době jsou uvolněné mastné kyseliny titrovány louhem na fenolftalein, nebo thymolftalein. Metody jsou různě modifikovány s cílem zkrátit inkubační čas, který trvá mnohdy až několik hodin, všechny tyto metody však jsou komplikované a časově náročné

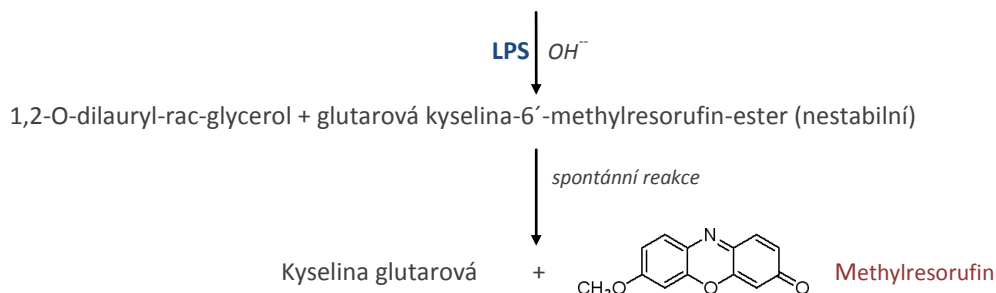
Turbidimetrické metody

Činností lipázy (ve zkoumaném vzorku) je projasňována emulze tuků ve vodě, která má mléčné zabarvení; rychlost reakce je měřena jako pokles turbidance roztoku

Bývalá diagnostická souprava PLIVA-Lachema Diagnostika: Lipasa (LIP UV 2x20); sérová lipáza katalyticky štěpí triolein na monoacylglycerol a kyselinu olejovou. Pokles absorbance substrátu, který je ve formě emulze, a který je úměrný katalytické koncentraci lipázy, se měří fotometricky (kinetickou metodou) v oblasti 330 – 360 nm; norma hodnot – do 3,16 $\mu\text{kat/l}$

Fotometrické metody:

- Komplex solí mastných kyselin s diethyldithiokarbamátem (DTC):** Volné mastné kyseliny, uvolněné z reakční směsi lipolýzou, se převedou na své měďnaté soli a znovu se extrahují do organické fáze obsahující diethyldithiokarbamát - vytvoří se komplex solí mastných kyselin s DTC, který má hnědou barvu a je snadno fotometrovatelný.
- Firma KODAK** ve svém analyzátoru EKTACHEM (suchá chemie) využívá jako substrát 1-oleoyl-2,3-diacetyl glycerol, k jeho emulgaci pak dodecylbenzensulfonát; ve složitém řetězci reakcí je konečným produktem *peroxid vodíku* a jeho následné stanovení *Trinderovou* (či obdobnou) reakcí
- Metodu s methylresorufinem** má, kromě jiných firem, i firma Sentinel CH., Milano, Itálie:
1,2-O-dilauryl-rac-glycero-3-glutarová kyselina-(6'-methylresorufin)-ester

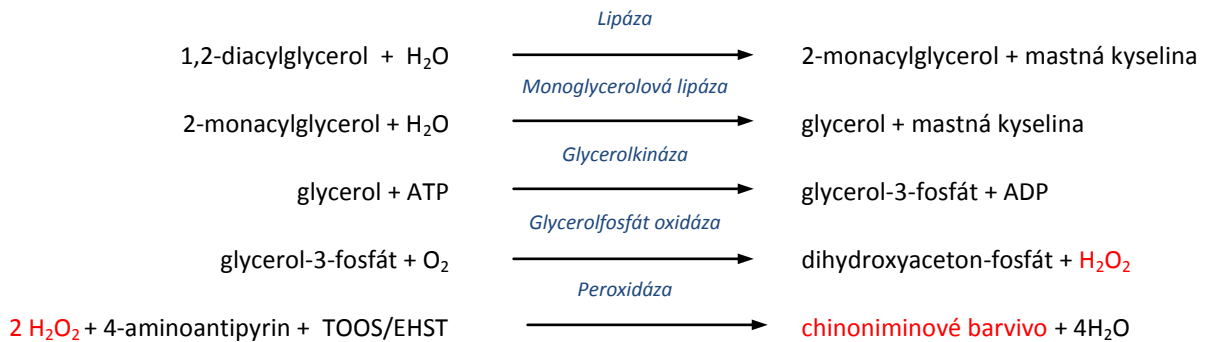


Aktivita lipázy se zjišťuje z rychlosti tvorby methylresorufinu fotometrií při 580 nm.

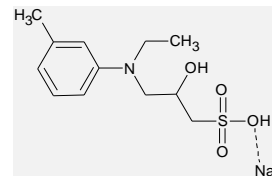
Enzymové stanovení aktivity lipázy

Metoda firmy *Reagents Applications, Inc., San Diego, California, USA, Olympus*, dnes *Beckman-Coulter, Brea, Orange County, California, USA, Wako* (Lipase L-Type), vlastníkem firmy je *Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan*, hlavní zastoupení pro *clinical diagnostic reagents* má firma v USA v Německu (Diagnostics) a pravděpodobně i jiných firem:

Pankreatická lipáza a kolipáza při pH 8,7 převedou 1,2-diacylglycerol na 2-monoacylglycerol a mastnou kyselinu. 2-monoacylglycerol je potom štěpen monoglycerolovou lipázou na glycerol a mastnou kyselinu. Glycerol je převeden za přispění dalších enzymů (2 reakce) na dihydroxyaceton fosfát a peroxid vodíku, který se stanoví modifikovanou *Trinderovou reakcí*:



TOOS/EHST = sodná sůl
N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-m-toluidinu



Metoda firmy Wako Chemicals USA, Inc., Richmond, VA: Pankreatická lipáza a kolipáza při pH 8,4 převedou 1,2-dilinoleoylglycerol na 2-monolinoleoylglycerol a kyselinu linolenovou, která je dále metabolizována sledem enzymově katalyzovaných reakcí převzatých z β -oxidace mastných kyselin. Výsledkem reakce je produkce jedné molekuly D-3-hydroxykaproyl-CoA, pěti molekul acetyl-CoA a pěti molekul NADH + H⁺ na jednu molekulu kyseliny linolenové; rychlost reakce se sleduje změnou absorbance při 340 nm (nárůst absorbance, *optický test*)

Lipázu lze stanovit i imunochemicky

Bylo popsáno mnoho způsobů pro stanovení lipázy imunochemicky, pouze však některé se dočkaly komerčního zavedení – např. Merck Lipase IMAC[®] je citlivá a specifická imunometoda založená na *sandwichové* technice (homogenní enzymová imunoanalýza s protilátkami proti pankreatické lipáze značenými křenovou peroxidázou).

Klinické poznámky

Stanovení lipázy v séru, plazmě, pleurální tekutině, výpotcích je prováděno s úmyslem odhalit chorobu slinivky břišní, obvykle pankreatitidu. Většinou se sleduje spolu s aktivitou α -amylázy, zde je potřeba dát pozor na akutní parotitidu, protože α -amyláza se nachází jak ve slinných žlázách, tak v pankreatu, ale lipáza se ve slinných žlázách nenachází, proto při parotitidě se její sérová aktivita nemění.

15.6.3.6. Proteázy jsou hydrolázy štěpící proteiny

Mezi hydrolázy patří velká skupina enzymů štěpících bílkoviny, tzv. *proteáz*. Bílkoviny mohou být štěpeny buď od konců proteinových řetězců (*exopeptidázy*) nebo zevnitř peptidického řetězce (*endopeptidázy*).

Z hlediska metabolismu jsou významné zejména endoproteázy, kam patří značná část trávicích enzymů, ale také např. většina *koagulačních faktorů*.

Endopeptidázy se dělí do skupin podle aminokyseliny vyskytující se v aktivním centru enzymu. Jednu skupinu tvoří metaloproteázy, u kterých se v aktivním centru vyskytuje kovový ion, velmi často Zn²⁺. Existuje i další způsob členění proteáz (rodiny, klany).

Zajímavou skupinou cysteinových proteáz je rodina *kaspáz* (angl. *caspase = cysteinyl aspartate-specific protease*), které jsou „exekutory“ *apoptózy*, programované buněčné smrti, ale účastní se i procesů vzniku zánětu a odumírání tkání, což je nekroza.

Přirozenými inhibitory proteáz jsou bílkoviny ze skupiny α_1 - a α_2 -globulinů (viz kapitola 10, str. 10-7), dále např. antitrombin a další. Inhibitorem cysteinových proteáz jsou cystatiny (viz kapitola 7, str. 7-16).

Podrobněji k proteázám např. na adrese: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd_ds4/hypertext/KZAAA.htm

EC - kód	Skupina proteáz	Příklady
3.4.21	<i>Serinové proteázy:</i>	Chymotrypsin, trypsin, trombin, plazmin, enterokináza; kromě faktorů V, VIII, XIII a fibrinogenu sem patří <i>všechny koagulační faktory</i>
3.4.22	<i>Cysteinové proteázy:</i>	Katepsin B, papain, bromelin; kaspázy
3.4.23	<i>Aspartátové proteázy:</i>	Pepsin
3.4.24	<i>Metaloproteázy:</i>	Karboxypeptidáza A (<i>s obsahem Zn²⁺</i>), prokolagen-N-proteináza

15.7. Stručné shrnutí úvodní části kapitoly

- Enzymy se v klinické laboratoři využívají jako analyty, k posouzení zdravotního stavu jedince, nebo jako specifická činidla (reagencie) v tzv. *enzymových analýzách*.
- Enzymy jsou biologické katalyzátory, které usnadňují a urychlují průběh chemických reakcí v živých organismech. Princip tohoto účinku spočívá ve snížení tzv. *aktivační energie*.
- Enzym váže v místě zvaném *aktivní centrum enzymu* ligand (substrát) za tvorby komplexu enzym-substrát (ES), který se následně rozpadá na produkty.
- Pevnost vazby komplexu ES je dána hodnotou *rovnovážné konstanty K*. Přirozeným substrátem enzymu je ten substrát, který má nejvyšší hodnotu K.
- Schopnost substrátu účinně se vázat s enzymem vyjadřuje tzv. *substrátová konstanta*. Má rozměr koncentrace. Koncentrace substrátu při které reakce běží poloviční maximální rychlostí se nazývá *Michaelisova konstanta*, případně *konstanta Michaelise a Mentenové* a označuje se K_m . Je to reciproká hodnota afinity enzymu k substrátu, tzn., že čím je hodnota K_m nižší, tím vyšší je afinita enzymu k substrátu.
- Enzymy vyžadují optimální podmínky pro svou činnost, zejména optimální teplotu, pH, iontovou sílu, koncentraci substrátu a přítomnosti aktivátorů.
- Allosterické enzymy obsahují dvě aktivní místa, jedno pro vazbu substrátu, druhé pro vazbu regulační molekuly. Regulační molekula má funkci vypínače, která „zapíná“ nebo „vypíná“ příslušný enzym. Základním regulačním okruhem tohoto typu je *negativní zpětná vazba*, kdy úlohu regulační molekuly přebírá substrát, který v nadbytku brzdí průběh reakce.
- Enzymové aktivity se vyjadřují v *katalech* nebo v *mezinárodních jednotkách*.
- Katalytická koncentrace je aktivita enzymu v jednotkovém množství příslušné tělní tekutiny. Vyjadřuje se v kat/l nebo v UI/l. V některých případech (např. u CK-MB) se nevyjadřuje aktivita enzymu, ale jeho množství, tj. masa enzymu v příslušném objemu tělní tekutiny, v g/l (*mass concentration*)..
- Enzymové analýzy se kalibrují s použitím enzymového kalibrátoru nebo produktem reakce.
- Enzymy se podle mezinárodní klasifikace dělí do šesti tříd: oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, izomerázy a ligázy. Celý kód má tvar EC X.X.X.X. Toto názvosloví se nazývá *systematické* či *vědecké*. Obecně užívané názvosloví zdůrazňuje substrát, případně i způsob jeho přeměny. Existuje i názvosloví *triviální*.
- Plazmatické enzymy se dělí do dvou skupin: na enzymy buněčné, které vykonávají svou funkci uvnitř buňky a na enzymy vylučované exokrinními žlázami. Tyto se pak dále dělí na skupinu enzymů produkovaných velkými žlázami gastrointestinálního traktu a na skupinu enzymů produkovaných hepatocyty.
- Další přístupy k dělení enzymů zdůrazňují obsah enzymu ve tkáni (orgánu), nebo lokalizaci enzymu v buňce, případně biologický poločas enzymu.
- Izoenzymy jsou molekuly enzymů, které katalyzují stejnou reakci, ale jejichž bílkovinná molekula se liší *primární strukturou* a tedy i *fyzikálně-chemickými vlastnostmi*. Mají rozdíly v primární struktuře molekuly, jsou to produkty různých genů.
- Alelozymy jsou produkty alelického genu, často se nazývají také izoenzymy
- Izoformy enzymů mají primární strukturu stejnou, liší se různým obsahem glycidů v molekule. Vykazují proto odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti. Jsou to produkty stejného genu.
- Makroenzymy jsou *polymery* enzymů nebo *komplexy* enzymu s imunoglobulinem, příčina vzniku neznámá

15.8. Doplnky k tématu ENZYMY

Dynamika některých enzymů po infarktu myokardu

Enzym	Začátek nárůstu [hodiny]	Maximum [hodiny]	Návrat k původnímu stavu [den]
CK	4 - 8	16 - 36	3. - 6.
AST	4 - 8	16 - 48	3. - 6.
LD	6 - 12	24 - 60	7. - 15.
HBD	6 - 12	30 - 72	10. - 20.

Zdroj: Kleineenzymfibel, Boehringer Mannheim, firemní materiál

Enzymové soubory

Jaterní poruchy

<i>Akutní virová hepatitida</i>	AST, ALT
<i>Alkoholické poškození jater</i>	GGT
<i>Steatosa jater</i>	ALT, CHE
<i>Chronická hepatitida</i>	AST, CHE
<i>Obstrukční ikterus</i>	ALT, ALP, GMD
<i>Jaterní tumor</i>	AST, GGT, GMD
Pankreas:	AMS, AMS v moči, LPS
<i>Dynamika AMS a LPS</i>	nárůst po 3 - 6 hodinách po klinických symptomech, maximum za 20 - 30 hodin, návrat po několika dnech
Krev	LD - diferencální diagnostika anémií, rozlišení hemolytického a hepatogenního ikteru, kontrola leukos
Kosterní svalstvo	CK, ALD (= aldoláza), ALT, AST, LD, HBD
Tumory	ALP, ACP, GGT
	Zvýšení GGT, termostabilní isoformy ALP (placentární), tartarát labilní isoenzym ACP

15.9. Kontrolní otázky

1. Uvědomte si co jsou to katalyzátory a jaká je jejich funkce. Jakou chemickou povahu mají biokatalyzátory? Je to jednotná skupina látek? Jak fungují? V jakém vztahu jsou některé vitamíny k enzymům?
2. Jaký je význam enzymů v laboratorní medicíně?
3. Jak je to s názvoslovím, řazením do enzymových tříd atd.?
4. Co je to Michaelisova konstanta? Za jakých podmínek je definována? Co vyjadřuje?
5. Co jsou to allosterické enzymy? Kolik mají aktivních míst? K čemu?
6. Víte co všechno ovlivňuje aktivitu enzymu? Umíte to vyjmenovat? Chápete praktické důsledky těchto skutečností v laboratorní praxi klinické medicíny?
7. Co je to allosterická inhibice? Co se při této inhibici děje s enzymem?
8. Jak se vyjadřují hodnoty aktivity enzymu? Jaká je SI jednotka? Existují i jiné jednotky?
9. Co si představujete pod pojmem „katalytická koncentrace“? Jaká je SI jednotka? Jsou i jiné?
10. Jaký je převažující mechanismus nárůstu katalytické koncentrace nějakého enzymu (např. ALT) v tělní tekutině, zejména v plazmě/séru?
11. Umíte rozdělit plazmatické enzymy do skupin (ne do tříd!)? Má toto třídění nějaký praktický význam? Pokud ano, jaký?
12. Chápete rozdíl mezi „izoenzymem“, „izoformou enzymu“ a „alelozymem“? Umíte to vysvětlit?
13. Má nějaký praktický význam stanovení aktivit izoenzymů/izoform? Pokud ano, umíte uvést alespoň jeden příklad?
14. A co třeba dimerní enzymy? Co ten pojem znamená? Jsou i třeba tetramerní enzymy? Pokud ano, které?
15. O které skupině (plazmatických) enzymů se učíte i v hematologii (tam se nazývají jinak než v klinické biochemii)? Co je to za enzymy?

OBSAH:

Kapitola 15 Enzymy	15-1
15.1. Enzymy jsou biologické katalyzátory	15-1
Teplota (tepelné optimum)	15-6
Koncentrace protonů, hodnota pH (pH optimum)	15-6
Efektory (aktivátory a inhibitory) ovlivňují aktivitu enzymů	15-6
Iontová síla	15-6
Substrát	15-6
15.1.1. Vyjadřování hodnot enzymových aktivit	15-7
15.1.2. Kalibrace enzymových analýz	15-8
15.2. Klasifikace enzymů	15-8
15.3. Význam enzymů a enzymologie v medicíně	15-9
15.4. Plazmatické enzymy můžeme rozdělit do dvou skupin	15-9
15.4.1. Enzymy buněčné vykonávají svou funkci uvnitř buňky	15-9
15.4.2. Sekreční enzymy jsou vylučované exokrinními žlázami	15-9
15.4.3. Další možnosti dělení enzymů	15-9
Dělení podle různého obsahu enzymu ve tkáních (orgánech)	15-9
Dělení podle subcelulární lokalizace enzymu	15-10
Dělení podle biologického poločasu enzymu	15-10
15.5. Izoenzymy a makroenzymy	15-10
15.6. Speciální enzymologie	15-11
15.6.1. Oxidoreduktázy	15-11
15.6.1.1. Laktátdehydrogenáza	15-11
15.6.1.2. Alfa-Hydroxybutyrátdehydrogenáza	15-14
15.6.1.3. Glutamátdehydrogenáza	15-14
15.6.2. Transferázy	15-15
15.6.2.1. Alaninaminotransferáza	15-15
15.6.2.2. Aspartátaminotransferáza	15-16
15.6.2.3. Gamaglutamyltransferáza	15-17
15.6.2.4. Kreatinkináza	15-19
15.6.3. Hydrolázy	15-21
15.6.3.1. Alkalická fosfatáza	15-21
15.6.3.2. Kyselá fosfatáza	15-24
15.6.3.3. Alfa-amyláza	15-25
15.6.3.4. Cholinesteráza	15-27
15.6.3.5. Lipáza	15-30
15.6.3.6. Proteázy jsou hydrolázy štěpící proteiny	15-32
15.7. Stručné shrnutí úvodní části kapitoly	15-33
15.8. Doplnky k tématu ENZYMY	15-34
Dynamika některých enzymů po infarktu myokardu	15-34
Enzymové soubory	15-34
15.9. Kontrolní otázky	15-35