

# Enzymy a lzoenzymy

## Principy metod a klinický význam

Petr Breinek

[breinek@seznam.cz](mailto:breinek@seznam.cz)

# Literatura

- Doporučení odborných společností  
[www.cskb.cz](http://www.cskb.cz)

Česká společnost  
klinické biochemie

Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně





česky | [english](#)

Hledat











ČSKB | Odborné akce | Vzdělávání | Časopisy | **Doporučení** | Stanoviska | Spolupráce | Sekce laborantů | Kvalita | Legislativa | Odkazy | Diskusní fórum

Kalkulátory

## Doporučení

Název	Vydáno	Smysl	Revize	Aktuální verze
Cílený screening celiakální spruce (CS)	únor 2009	Na vzniku tohoto programu se aktivně podíleli členové Komise MZ ČR pro CS, text byl projednán a podpořen 15 odbornými společnostmi ČLS JEP		<i>aktuální</i> Publikováno v Klin. Biochem. Metab., 17 (38), 2009, No. 1, p. 55–56 (  <a href="#">pdf ke stažení</a> )
Doporučení České nefrologické společnosti a České společnosti klinické biochemie ČLS JEP k vyšetřování glomerulární filtrace	březen 2009	orientace v postupech vyšetření glomerulární filtrace		<i>aktuální</i> Publikováno v Klin. Biochem. Metab., 17 (38), 2009, No. 2, p. 109–117.  <a href="#">PDF ke stažení</a>

# ➤ Jiné zdroje - www.labtestonline.cz

DOMŮ  AU  DE  ES  GR  HU  IT  PL  UK  US 

## Lab Tests Online<sup>CZ</sup>

Informace pro laickou a odbornou veřejnost o laboratorních vyšetřeních

Nekomerční web

*K rychlé navigaci v rámci Lab Tests Online použijte tlačítko Hledat a níže uvedená menu*

Hledat

Vyšetření

Nemoci a obtíže

Screening

► ÚVODNÍ STRÁNKA

► NOVINKY

► O LABORATORNÍM VYŠETŘENÍ

► O NÁS


► MAPA STRÁNEK


► SLOVNÍČEK

► PODMÍNKY UŽITÍ

► VYŠETŘENÍ

provozovatelé

 ČESKÁ SPOLEČNOST KLINICKÉ BIOCHEMIE

 CZEDMA

### ALT

**Další název:** glutamát-pyruvát dehydrogenáza (GPT)  
**Oficiální název:** Alaninaminotransferáza  
**Související vyšetření:** [AST](#), [ALP](#), [Bilirubin](#), [Jaterní profil](#)

### Vyšetření

**Jak je vyšetření využíváno?**  
**Kdy je vyšetření požadováno?**  
**Co výsledek vyšetření znamená?**  
**Další informace v souvislosti s tímto vyšetřením**

**Jak je vyšetření využíváno?**  
ALT stoupá při jaterních nemocech. ALT je hodnoceno spolu s dalšími enzymy, jako je alkalická fosfatáza (ALP) a aspartátaminotransferáza (AST) a dalšími testy s cílem lépe určit jaterní onemocnění.

**Kdy je vyšetření požadováno?**  
Lékař indikuje vyšetření ALT (a řadu dalších testů) při

- > Základní informace
- > Vyšetřovaný parametr
- > Vyšetření
- > Informace o laboratorním vyšetření
- > Časté otázky
- > Další dotazy
- > Literatura a odkazy

#### GLOSSARY

- Ikterus
- Enzym
- Cirhóza

# ➤ Jiné zdroje - www.sekk.cz



Home



Akreditovaný organizátor  
programů zkoušení  
způsobilosti č. 7004

EHK (EQA)

SLP

EDU

Prodej

Infoservis

O nás ...

## Informační servis

### Obsah

[Základní informace](#)

[Obecné edukační texty \(metrologie, návaznost, nejistoty, doporučené postupy, ...\)](#)

[AIM - Autoimunita](#)

[AKS - Analyty krevního séra](#)

[CSF - Klinicko-biochemická analýza likvoru](#)

[DD - D Dimery](#)

[DIF - Hodnocení nátěru periferní krve](#)

[KD - Sledování kompenzace diabetu](#)

[KM - Kardiální markery](#)

[KO - Krevní obraz](#)

V následující tabulce naleznete seznam edukačních textů, dokumentů, odkazů a nástrojů, které jsou seřazeny dle tématických okruhů.

Řada dokumentů je ve formátu [PDF](#).

Dokument

Datum  
zveřejnění

# ÚVOD

enzymé „ v kvasinkách“

1926 J.Sumner: ureasa (bílkovinná povaha)

1. makromolekuly **bílkovin**
2. **biokatalyzátory**

snižují aktivační energii potřebnou pro chemickou reakci

Enzym + **Substrát**  $\leftrightarrow$  komplex ES  $\rightarrow$  **Produkt** + Enzym

1 buňka živých organismů obsahuje až 3000 druhů enzymů

# Izoenzymy

- Řada enzymů má stejné nebo velmi podobné katalytické účinky, **liší se v primární struktuře** (složením aminokyselin).

Pokud tyto změny mají **genetický základ**, tak tyto rozdílné formy jednoho enzymu nazýváme **izoenzymy**

- Liší se fyzikálními, chemickými a imunologickými vlastnostmi

# Makroenzymy

- Pokud jsou rozdíly ve struktuře způsobené sekundárními změnami, např.
  - glykosylací
  - tvorbou komplexů s imunoglobuliny

takové formy enzymů nazýváme makroenzymy (nejsou to izoenzymy!)

- Podle místa působení:
  - extracelulární (krev, likvor,...)
  - intracelulární (cytoplazma, buněčné organely)
- Podle formy výskytu:
  - rozpuštěné, volné
  - imobilizované ( např. na buněčných membránách)
  - neaktivní proenzymy (zymogeny-např. pepsinogen, protrombin,...)
  - izoenzymy
  - asociované (multienzymové komplexy)



# Složení enzymové molekuly

- **bílkovinná část**      apoenzym
- **nebílkovinná část**      **kofaktor**

Kofaktor:

- **Prostetická skupina** (  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , ): pevně vázaná
- **Koenzym** (  $NAD^+$ , P5P ): disociovatelná molekula

# Metody stanovení

## 1. Katalytická koncentrace aktivity enzymů

### ▶ Spektrofotometrické metody

- Kinetické měřící postupy

- (end-point)

### ▶ (Titrační, aj.)

## 2. Hmotnostní koncentrace enzymů

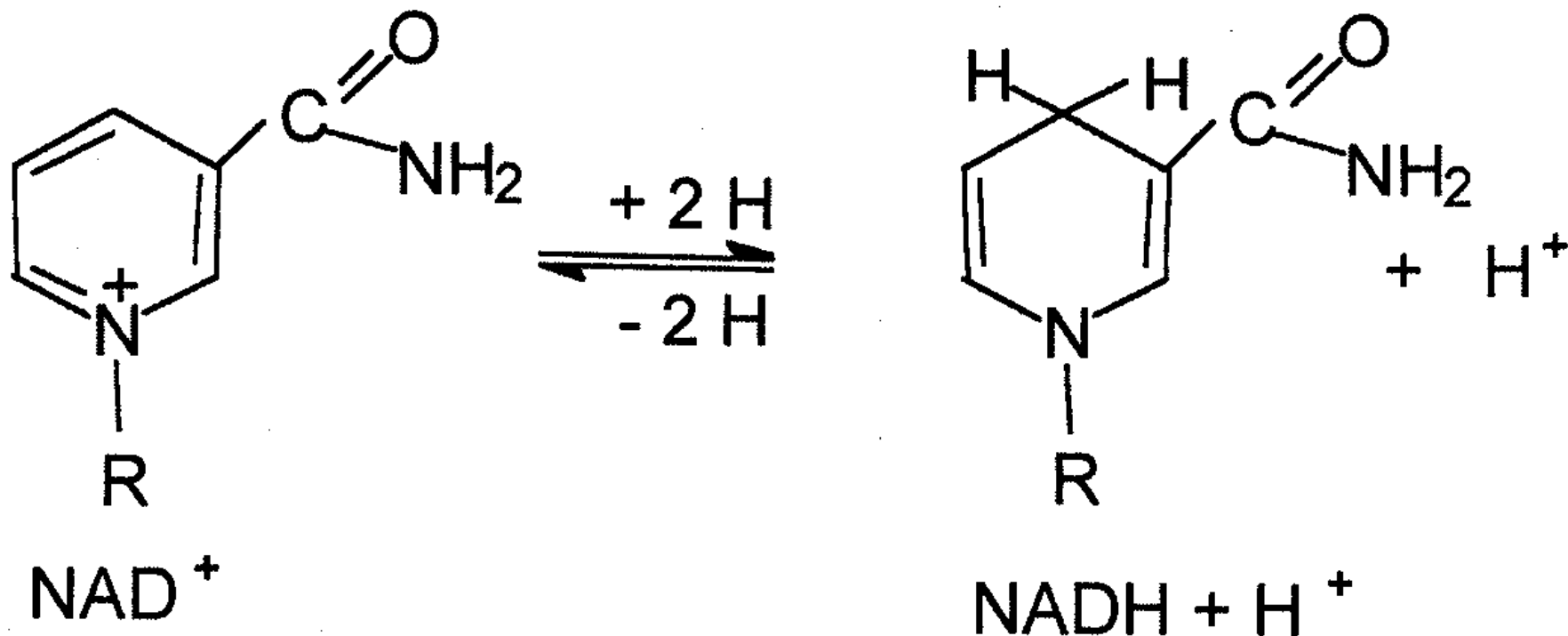
### ▶ Imunoanalytické metody

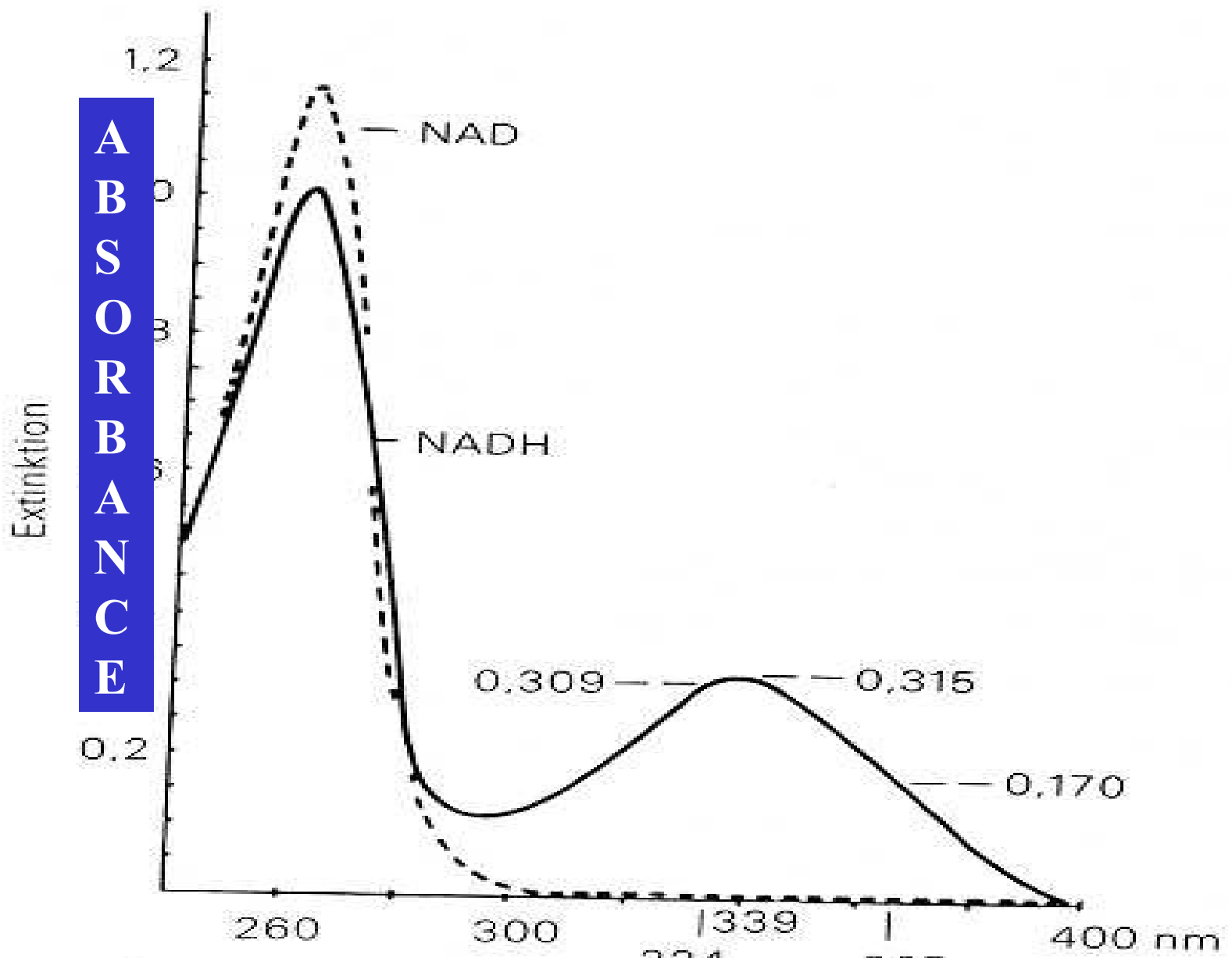
## Kinetické měřicí postupy

spektrofotometrické stanovení rychlosti  
enzymové reakce kontinuálním měřením  
absorbance v závislosti na čase

# Optický test

měříme změny absorpance v **UV-oblasti**  
(při 340 nm) způsobené změnami koncentrace  
redukovaných forem **koenzymů NADH + H<sup>+</sup>**  
nebo **NADPH + H<sup>+</sup>**





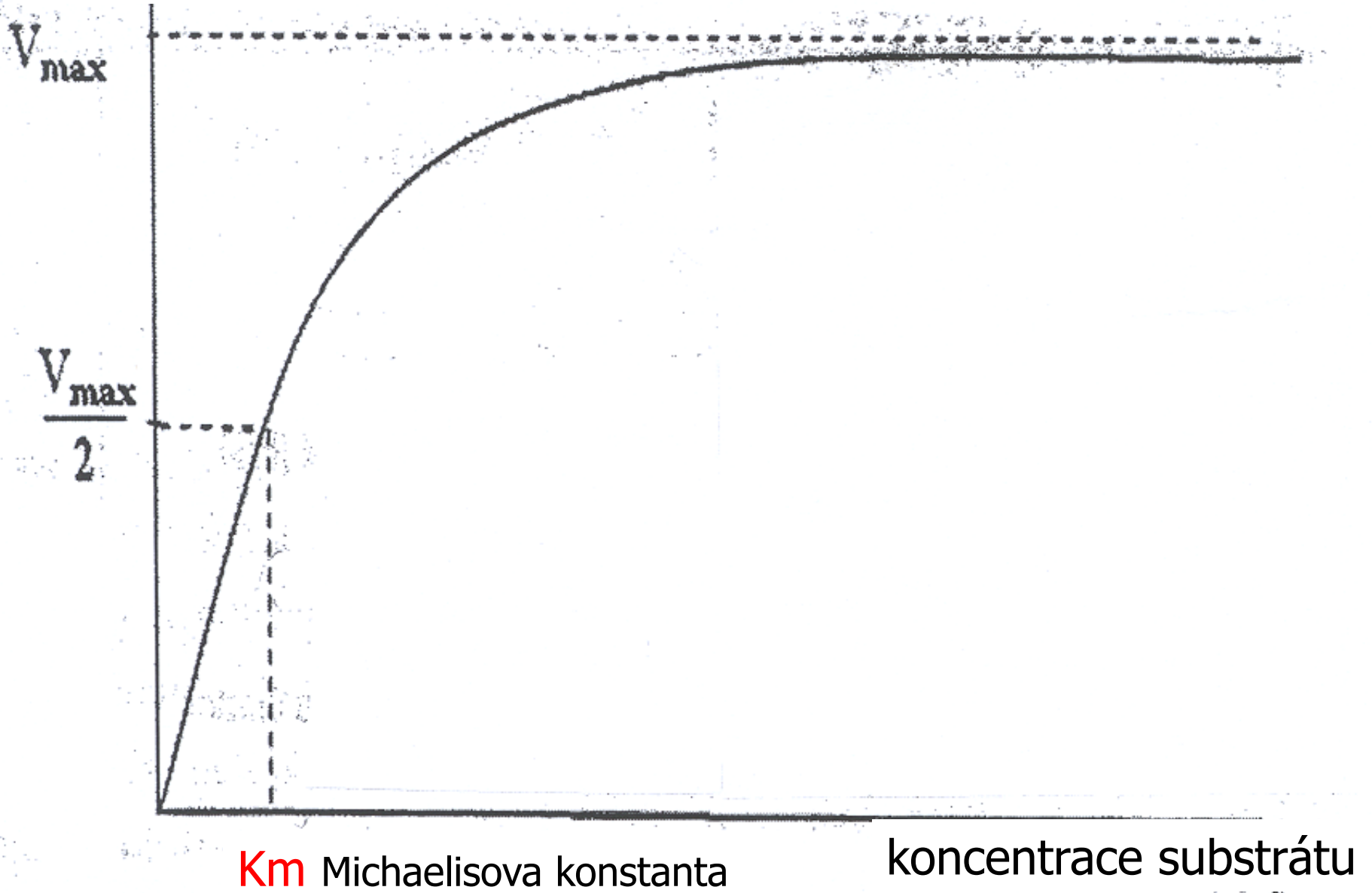
ABSORBANCE

VLNOVÁ DÉLKA

# Vyjadřování výsledků měření

- Katalytická aktivita enzymu  
jednotka katal (kat)  
definice:  $1 \text{ kat} = 1 \text{ mol/s}$
- Katalytická koncentrace aktivity enzymu  
jednotka:  $\text{kat/l}$   
používané jednotky:  $\mu\text{kat/l}$  a  $\text{nkat/l}$   
jiné jednotky:  $\text{U/l}$   
 $1 \text{ kat/l} = 60 \text{ U/l}$        $1 \text{ U/l} = 0,0167 \text{ kat/l}$

# reakční rychlost



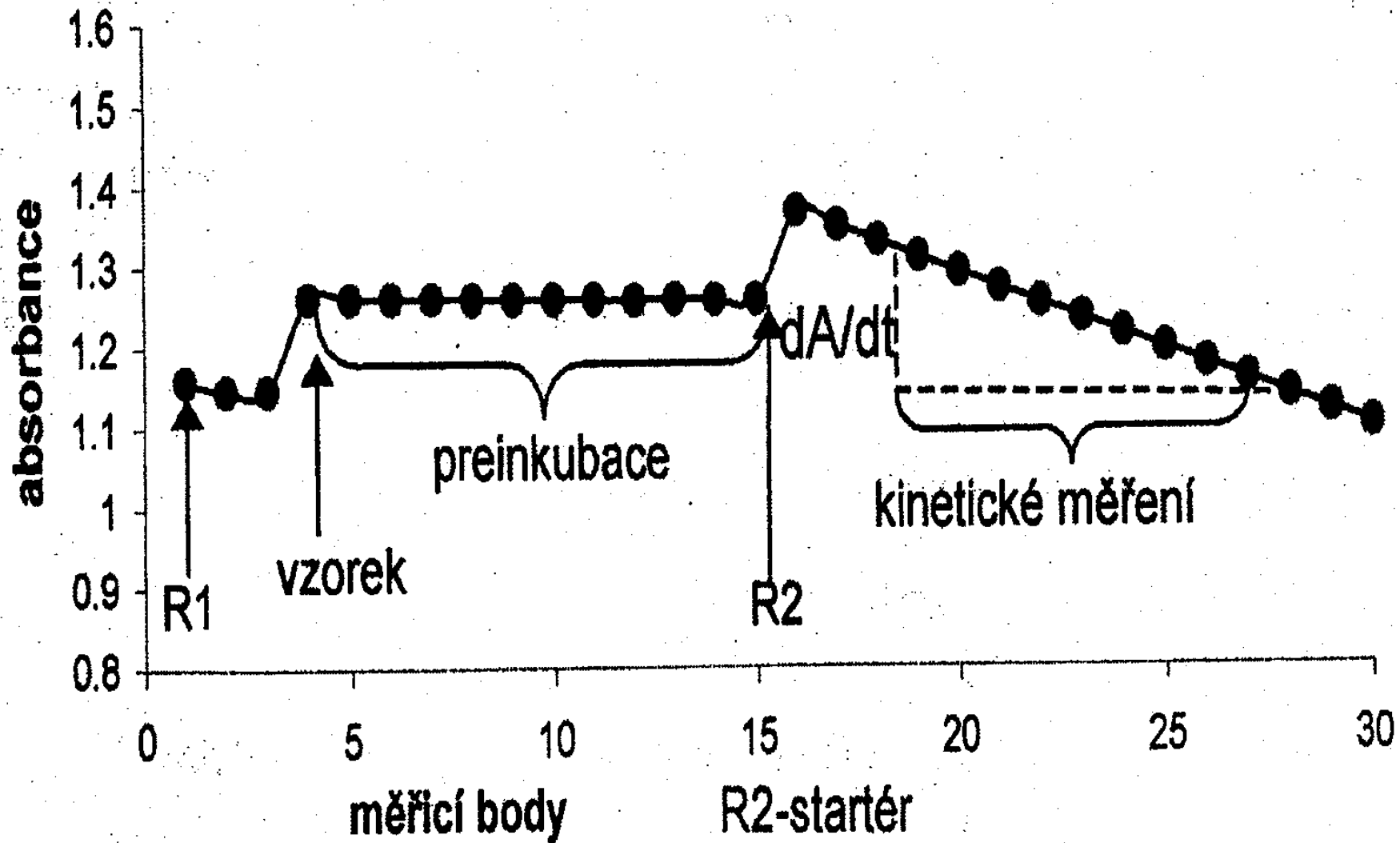
# Faktory ovlivňující enzymovou reakci

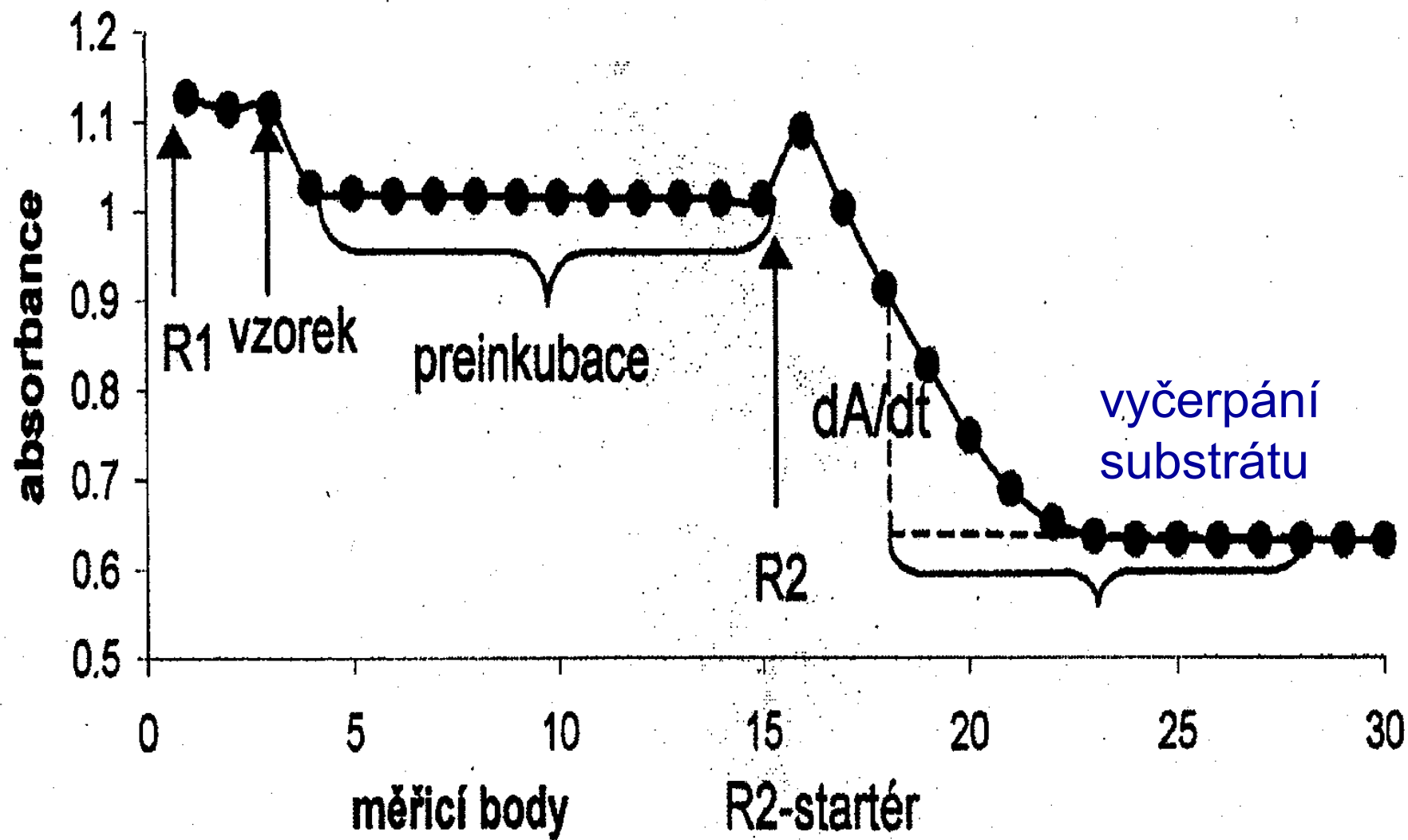
1. Teplota ( 25 - 30 - 37 °C)
2. Pufra (pH, iontová síla, typ pufru)
3. Koncentrace substrátu
4. Koncentrace koenzymu
5. **Moderátory enzymové aktivity**
  - **inhibitory** (kompetitivní a nekompetitivní)
  - **aktivátory**

často se volí kompromis mezi zjištěnými optimálními podmínkami, cenou reagensů a technickými požadavky



# Vliv časového intervalu, ve kterém měříme





# Velmi dobrá srovnatelnost výsledků

- Jak se to podařilo?
- Referenční metody IFCC
- Návaznost rutinních metod na referenční metody
- Certifikovaný referenční materiál (CRM)
- Mezinárodní síť referenčních laboratoří
- Existence referenčních intervalů

# Metody IFCC a primární CRM

GGT	IRMM/IFCC 452 (ERM-AD 452)
LD	IRMM/IFCC 453 (ERM-AD 453)
ALT	IRMM/IFCC 454 (ERM-AD 454)
CK	IRMM/IFCC 455 (ERM-AD 455)
AMS	IRMM/IFCC 456 (ERM-AD 456)
AST	IRMM/IFCC „new“

v přípravě:  
ALP a LPS

# KALIBRACE enzymových metod

- Primární CRM
- Sekundární CRM
- Pracovní kalibrátory výrobců
- Pracovní kalibrátory uživatelů

(Kalibrační faktor vypočítaný z teoretického molárního absorpčního koeficientu nebo stanoveného experimentálně)

# AST

L-aspartát + 2-oxoglutarát  $\leftrightarrow$  oxalacetát + L-glutamát

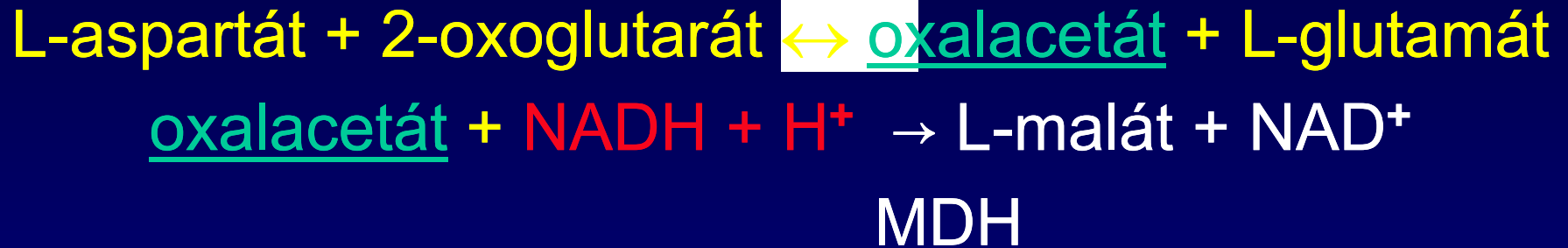
Je obsažena v cytoplasmě(65%) a v mitochondriích(35%) všech buněk ( zvláště hepatocytů, buněk srdečního svalu, ledvin a kosterních svalů)

# AST

## Klinický význam

- onemocnění myokardu (nekróza, AIM)
- jaterní choroby
- onemocnění kosterního svalstva

# AST



**SPEKTROFOTOMETRICKY** - pokles absorbance NADH při 340 nm

- pyruvát + NADH + H<sup>+</sup> ████████ laktát + NAD<sup>+</sup>
- **koenzym:** **pyridoxal-5-fosfát** + ApoAST ████████ AST\*
- doporučuje se předinkubace 10 min při +37°C
- start : 2-oxoglutarát ( 2 činidlová metoda)
- start : sérum ( 1 činidlová metoda)



# ALT

L-alanin + 2-oxoglutarát  $\rightleftharpoons$  pyruvát + L-glutamát

Je obsažena v cytoplasmě všech buněk, zvláště hepatocytů, buněk srdečního svalu, ledvin a kosterních svalů

# ALT

## Klinický význam

- onemocnění jater (infekční virová hepatitida, mononukleóza, chronické jaterní choroby,...)
- onemocnění žlučových cest
- dekompenzované srdeční vady (venostáza v játrech)
- poškození svalstva

# ALT

L-alanin + 2-oxoglutarát  $\rightleftharpoons$  pyruvát + L-glutamát

pyruvát + NADH + H<sup>+</sup>  $\rightleftharpoons$  -laktát + NAD<sup>+</sup>

LD

SPEKTROFOTOMETRICKY - pokles absorbance NADH při 340 nm

- pyruvát + NADH + H<sup>+</sup>  $\rightleftharpoons$  -laktát + NAD<sup>+</sup>
- **koenzym:** **pyridoxal-5-fosfát** + ApoALT  $\rightleftharpoons$  ALT\*
- doporučuje se předinkubace 10 min při +37°C
- start : 2-oxoglutarát ( 2 činidlová metoda)
- start : sérum ( 1 činidlová metoda)

# AMS

štěpí ■■■,4 glykozidické vazby

**POLYSACHARIDY ■■■ OLIGOSACHARIDY ■■■ MALTÓZA**

AMS je sekreční enzym vytvářený pankreatem a slinnými žlázami, (část vzniká v játrech, plících)

Sérum obsahuje přibližně stejnou katalytickou koncentraci pankreatického a slinného izoenzymu.

doporučená metoda IFCC: substrát  
(EPS-G7-PNP)

4,6-ethyliden(G7)-4-nitrofenyl(G1)- $\alpha$ -(1,4)-D-maltoheptaosid

1 molekula EPS

4,6-ethyliden(G7)-4-nitrofenyl(G1)- $\alpha$  1,4)-D-maltoheptaosidu



7 molekul glukózy + 1 molekula 4-nitrofenolu

SPEKTROFOTOMETRICKY: ABSORBANCE 4-NITROFENOLU  
405 nm

# AMS

## Klinický význam

- onemocnění pankreatu (akutní pankreatitida)
- onemocnění slinných žláz ( parotitis)
- přítomnost makroamylasového komplexu
- onemocnění jater
- ledvinná nedostatečnost

# Izoenzymy AMS

- SLINNÝ
- PANKREATICKÝ

(geneticky podmíněný polymorfismus)

- ▶ MAKROAMYLÁZOVÝ komplex = komplexy glykosylovaných izoenzymů s imunoglobulíny a jinými bílkovinami v séru

Mr = 400 000 až 2 000 000

■ působuje zvýšení hodnot AMS v krevním séru



## Metody stanovení

1. SELEKTIVNÍ INHIBICE isoenzymů monoklonálními protilátkami, např. stanovení pankreatické AMS
2. ELEKTROFORÉZA
3. CHROMATOGRRAFIE
4. IZOELEKTRICKÁ FOKUZACE
5. INHIBIČNÍ metody

# LPS

TRI- a DIACYLGLYCEROLY + H<sub>2</sub>O → GLYCEROL + 3-,2 MK

Výskyt: pankreatická lipáza  
jaterní lipáza  
lipoproteinová lipáza,...

### 3. CHROMOGENNÍ (fotometrické)

štěpení syntetických substrátů

a) substrát : 1,2-DIGLYCERID

1,2-diglycerid + H<sub>2</sub>O → 2-monoglycerid + mastná kyselina

2-monoglycerid + H<sub>2</sub>O → **glycerol** + mastná kyselina

glycerol + ATP → glycerol-3-fosfát + ADP

Glycerol-3-fosfát + O<sub>2</sub> → dihydroxyacetonfosfát + **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4-AAP + deriv.fenolu → 4 H<sub>2</sub>O + **barevný derivát**

b) substrát : 1,2-o-DILAURYL-rac-GLYCERO-3-  
GLUTARIC ACID-(6 -METHYLRESORUFIN) ESTER  
DGGR (patent Roche)

DGGR →

1,2-o-DILAURYL-rac-glycerol +  
GLUTARIC ACID-6 -METHYLRESORUFIN ESTER

GLUTARIC ACID-6 - METHYLRESORUFIN ESTER 

GLUTARIC ACID + METHYLRESORUFIN

chromogen

SPEKTROFOTOMETRICKY: ABSORBANCE METHYLRESORUFINU  
při 580 nm

# ALP

monoestery kyseliny o-fosforečné + H<sub>2</sub>O



alkohol / fenol + fosfátový anion

Vyskytuje se prakticky ve všech tkáních, je součástí buněčných membrán

V séru dospělých zdravých osob převažují jaterní izoenzymy,  
u dětí je zvýšena aktivita kostního izoenzymu,  
u těhotných žen je detekovatelný placentární izoenzym a  
u osob s krevní skupinou 0 a B jsou přítomny stopy střevního izoenzymu.

## Klinický význam:

- onemocnění jater
- onemocnění žlučových cest
- onemocnění kostí
- fyziologicky zvýšené hodnoty: rostoucí děti a těhotné ženy (max. 3 trimestr těhotenství)
- zánětlivé střevní choroby

## Metody stanovení:

Substrát: **4-NITROFENYLFOSFÁT**

4-NITROFENYLFOSFÁT + H<sub>2</sub>O → 4-NITROFENOL +  
fosforečnan

**SPEKTROFOTOMETRICKY: ABSORBANCE 4-NITROFENOLU při 405 nm**

- pufr AMP ( 2-amino-2-methyl-propanol)
- pufr MEG ( N-methylglukamin)



# Izoenzymy ALP

1. IMUNOCHEMICKY ( kostní ALP)
2. ELEKTROFORÉZA
3. INAKTIVAČNĚ - INHIBIČNÍ metody
4. srážení LEKTINEM ( kostní izoenzym)

# CK



V cytoplazmě a mitochondriích buněk kosterního svalstva, srdce a mozku.

v myokardu: 80% CK-MM a 20% CK-MB  
v kosterním svalstvu: 98% CK-MM a 2% CK-MB(!)

## Klinický význam:

- onemocnění kosterního svalstva
- onemocnění srdečního svalu (infarkt myokardu)
- onemocnění centrální nervové soustavy (CNS)

# Metody stanovení:

## 1. IFCC (37 C)

KREATINFOSFÁT + ADP → KREATIN + ATP

ATP + D-GLUKOSA ⇒ ADP + D-GLUKOSO-6-FOSFÁT

HEXOKINASA

D-GLU-6-P + NADP+ → D-GLUKONÁT-6-P + NADPH+H+

G6PD

SPEKTROFOTOMETRICKY -nárůst absorbance NADPH při 340 nm

REAKTIVACE: doporučuje se N-ACETYL CYSTEIN ( NAC)

# Izoenzymy CK

CK je DIMER skládající se ze 2 podjednotek:

M ( muscle) a B (brain)

kombinací vznikají 3 izoenzymy: CK-MM, **CK-MB**, CK-BB

je možné detekovat i makroenzym: CK- makro

Izoformy izoenzymů: CK-MB1 a CK-MB2

CK-MM1, CK-MM2 a CK-MM3

## Metody stanovení:

### 1. IMUNOCHEMICKY

CK-MB mass (hmotnostní koncentrace)

CK-MB mass: zvyšuje se asi o 1h dříve než CK-MB aktivita

je kardiospecifický

vyšší analytická citlivost stanovení

## 2. IMUNOINHIBIČNĚ

(s protilátkou proti M-podjednotkám CK)

CK-MM	M	M	+ANTI-M	M	M
CK-MB	M	B		M	B
CK-BB	B	B		B	B

Předpoklad: CK-BB v séru nepřítomen (=0)

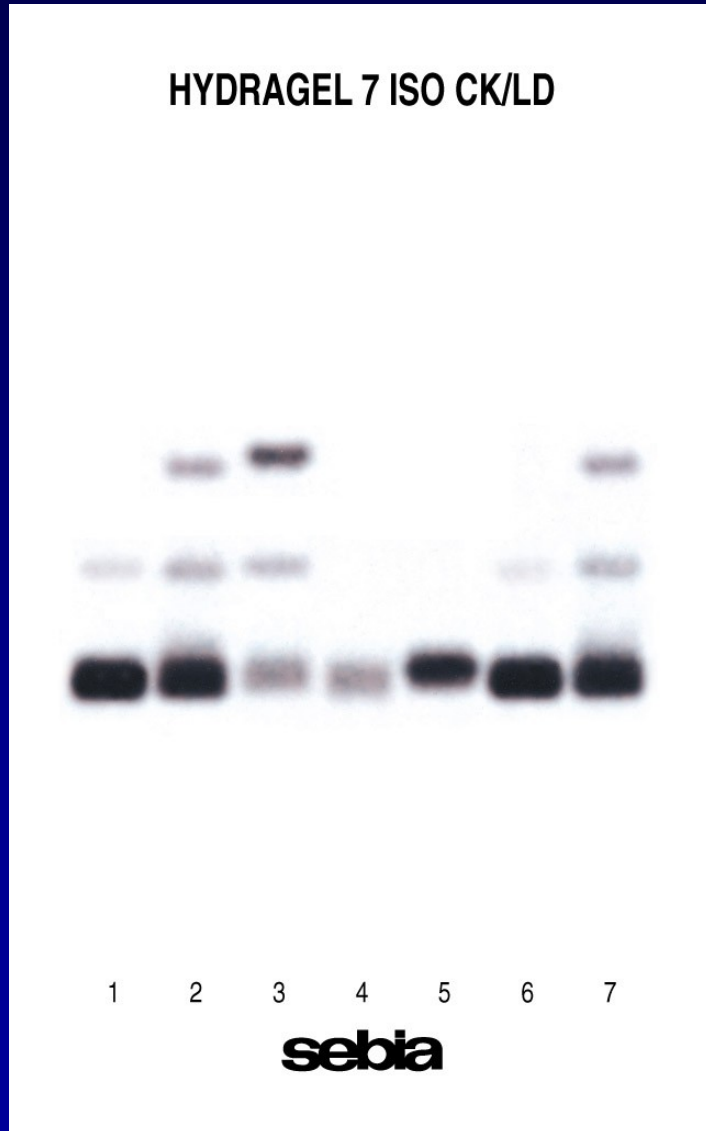
*potom:* pokud CK-BB = 0 (nepřítomen)

a CK-MM = 0 (inhibice)

stanovíme aktivitu CK-B (tj. polovinu přítomného CKMB)

$$CK-MB = 2 \times CK-B$$

# Izoenzymy CK



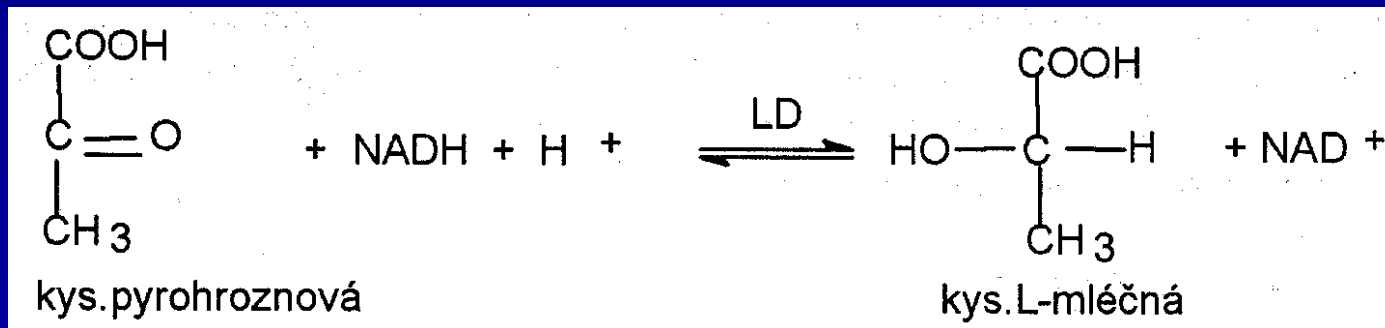


# LD

- Cytoplasmatický enzym, který katalyzuje reakci anaerobní glykolýzy, to vysvětluje přítomnost LD ve všech tkáních.



- Zvýšení jeho aktivity v krvi není orgánově specifické



## Klinický význam:

- onemocnění srdečního svalu (infarkt myokardu, myokarditida)
- onemocnění svalů
- hemolytická a perniciozní anémie
- onemocnění jaterního parenchymu
- maligní choroby (tumory, leukémie)

Zvýšení jeho aktivity v krvi není orgánově specifické → stanovení dnes slouží spíše k vyloučení onemocnění

## Metody stanovení:

### 1. IFCC (37 C)

Substrát: L-laktát



SPEKTROFOTOMETRICKY -nárůst absorbance NADH při 340 nm

### 2. Substrát: pyruvát



SPEKTROFOTOMETRICKY -pokles absorbance NADH při 340 nm

# Izoenzymy LD

- Aktivní enzym je tetramér - skládá se ze 4 podjednotek
- Existují 2 druhy podjednotek:  
M( muscle/sval) a H (heart/srdce)
- Kombinací vzniká 5 izoenzymů :

LD1	H4
LD2	H3M
LD3	H2M2
LD4	HM3
LD5	M4

## Metody stanovení:

### 1. ELEKTROFORÉZA

detekce elektroforeogramu



# Izoenzymy LD



# GGT

Katalyzuje přenos  $\gamma$ -glutamyllového zbytku z glutamylpeptidů na jiný akceptor (např. peptid nebo aminokyselinu)

GGT je vázána na cytoplasmatické membrány epitelu žlučových cest, ledvinných tubulů, jater, pankreasu, střeva, erytrocytů, ...)

V krvi dokazatelný enzym je převážně jaterního původu.

## Klinický význam:

- onemocnění jater
- obstrukce žlučových cest
- sekundární nádory jater
- monitorování chronického alkoholismu  
(poškození jater alkoholem)



# 1. IFCC (37 C)

Substrát:

■ L-glutamyl-3-karboxy-4-nitranilid (GLUCANE)



Glygly = GLYCYLGLYCIN

# CHE

hydrolýza

estery CHOLINU + H<sub>2</sub>O → CHOLIN + příslušná kyselina

- **Acetylcholinesterázy**



je obsažena v erytrocytech, mozku, plicích,  
štěpí přednostně acetylcholin (nervová zakončení)

- **Pseudocholinesterázy**

pochází z ribosomů jaterních buněk → krev  
→ sérum a plazma

## Klinický význam:

*Patologické je především snížení aktivity.*

- **poruchy proteosyntézy**
  - těžké hepatopatie
  - hladovění organismu
- **otravy** (intoxikace) organofosfáty  
(nekompetitivní inhibitory)
- vrozené chyby, atypické varianty

## Metody stanovení:

butyrylthiocholin + H<sub>2</sub>O → thiocholin + butyrát

thiocholin + DTNB  5-merkapto-2-nitrobenzoová kyselina

*žluté zbarvení*

DTNB = kyselina 5,5 dithio-bis-nitrobenzoová  
Ellmanovo činidlo

## Metody stanovení:

acetylthiocholin + H<sub>2</sub>O → thiocholin + acetát

thiocholin + DTNB 5-merkapto-2-nitrobenzoová  
kyselina

# Enzymy v moči

1. AMS

2. NAG ( N-acetyl-beta-glukózaminidáza)

TUBULÁRNÍ postižení LEDVIN

# Tumorové markery

## **NSE**

neuronspecifická enoláza

cytoplazmatický, glykolytický izoenzym enolázy  
(katalyzuje přeměnu 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát)

## **TK**

thymidinkináza

enzym podílející se na syntéze DNA  
ukazatel buněčné proliferace