

Enzymy a Izoenzymy

Analytika
(Principy metod a klinický význam)

Petr Breinek

Enzymy

enzymé „ v kvasinkách“

1926 J.Sumner: ureasa (bílkovinná povaha)

1 buňka živých organismů obsahuje až 3000 druhů enzymů

1. makromolekuly **bílkovin**

2. **biokatalyzátory**

- **Enzymy snižují aktivační energii potřebnou pro chemickou reakci**

Obecné vlastnosti enzymů

- Proteiny
- Katalyzátory
- Specifický účinek
- Vysoká účinnost:
 - účinnost o mnoho řádů vyšší než u jiných katalyzátorů
 - reakce s enzymem jsou o 10^6 - 10^{14} rychlejší než bez enzymu
- Mohou být regulovány

Jak reaguje enzym se substrátem

- vazba substrátu do **aktivního místa** vyvolá odpovídající konformační změnu molekuly enzymu
- vytvoří se **komplex enzym-substrát**



Složení enzymové molekuly

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

Kofaktor:

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

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
 - nejsou to izoenzymy!

Metody stanovení katalytické koncentrace aktivity enzymu

Kinetické

- Spektrofotometrické stanovení rychlosti enzymové reakce kontinuálním měřením absorbance v závislosti na čase
- Průběžně se měří nebo [P]
- Řada měření

$$\Delta A / \Delta t = \frac{A_2 - A_1}{t_2 - t_1}$$

Konstantního času

- „dvoubodové stanovení“
- „end-point“
- Měří se [P] po proběhnutí reakce
- Jedno měření
fotometrické sledování změny absorbance (přírůstek produktu nebo úbytek substrátu) za časovou jednotku (nevíme, co se v reakční směsi děje!), většinou v daném čase zastavujeme enzymovou reakci (např. denaturace a kolorimetrické vybarvení produktů)
- **nedoporučovány**

Množství enzymu v biologickém materiálu lze vyjádřit dvojím způsobem

Nepřímé stanovení

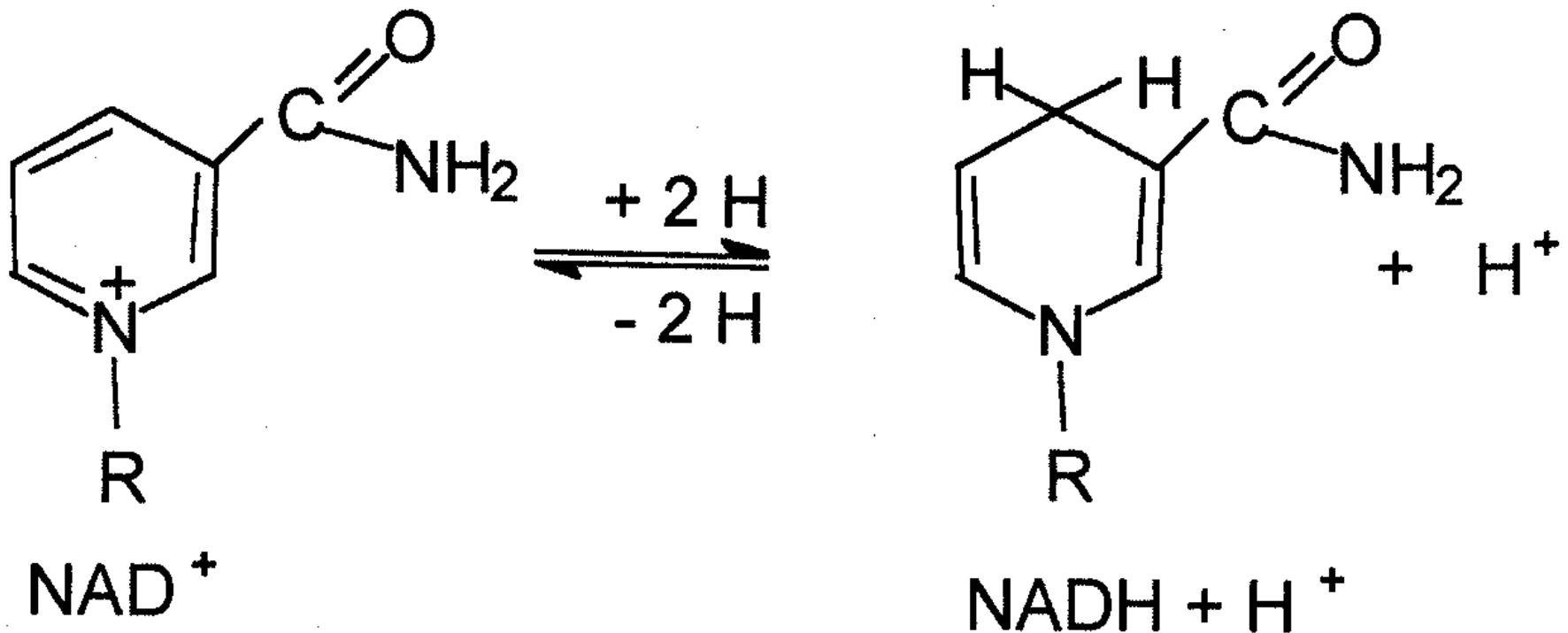
- katalytická koncentrace aktivity
- **$\mu\text{kat/l}$**
- stanoví se produkt enzymové reakce
- většina klinicky významných enzymů

Přímé stanovení

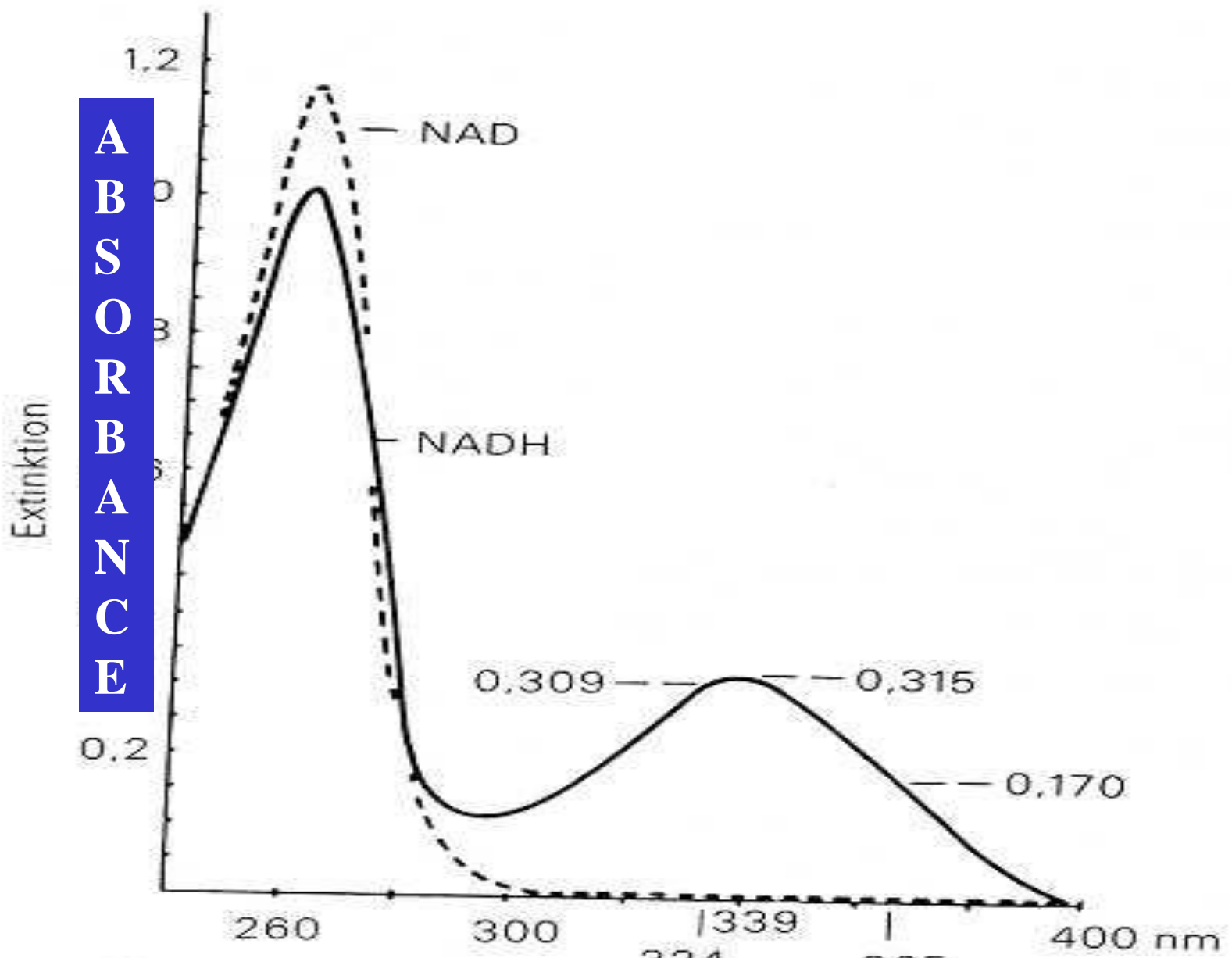
- hmotnostní koncentrace
- **$\mu\text{g/l}$, ng/l**
- stanoví se molekula enzymu jako antigen (imunochemicky)
- např. tumorové markery, ALP kostní

Optický test

měříme změny absorpance v **UV-oblasti**
(při 340 nm) způsobené změnami koncentrace
redukováných forem **koenzymů NADH + H⁺**
nebo **NADPH + H⁺**



**A
B
S
O
R
B
A
N
C
E**



VLNOVÁ DÉLKA

Vyjadřování výsledků měření

- Katalytická aktivita enzymu

jednotka katal (**kat**)

definice: $1 \text{ kat} = 1 \text{ mol/s}$

- Katalytická koncentrace aktivity enzymu

jednotka: **kat/l**

používané jednotky: **$\mu\text{kat/l}$ a nkat/l**

jiné jednotky: U/l

$$1 \mu\text{kat/l} = 60 \text{ U/l}$$

$$1 \text{ U/l} = 0,0167 \mu\text{kat/l}$$

Názvosloví enzymů

- ▶ triviální / historické Diastáza
- ▶ obecně užívané α -Amyláza (AMS)
- ▶ systémové (vědecké)
1,4- α -D-glukan glukanohydroláza, EC 3.2.1.1.

ENZYME COMMISSION International Union of Biochemistry and Molecular Biology

EC 3. TYP KATALYZOVANÉ REAKCE

EC 3.2.1. SUBSTRÁTY

EC 3.2.1.1. KATALOGOVÉ ČÍSLO

Třídění enzymů

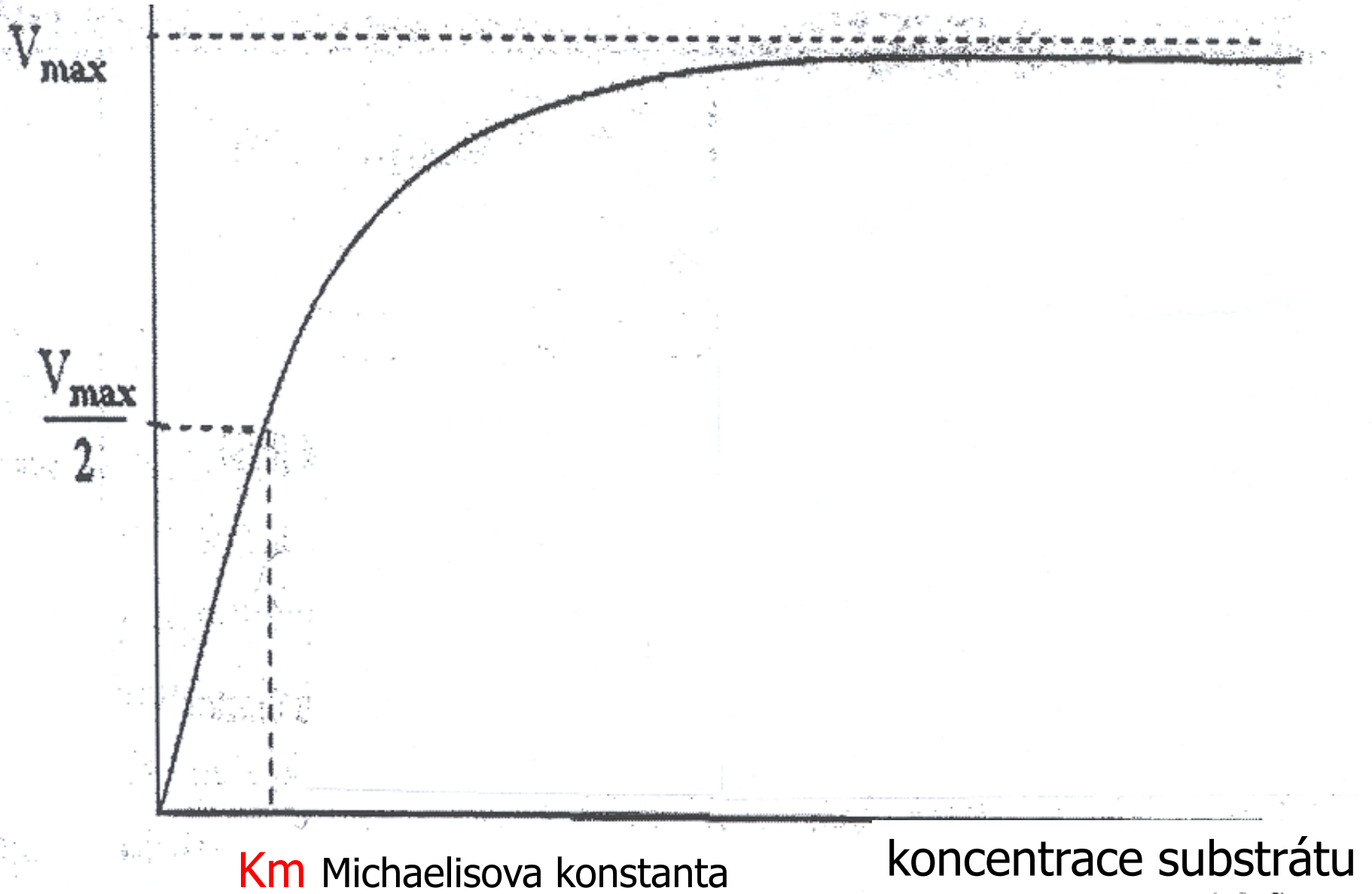
1. Oxidoreduktázy (LD, GLDH, CHOD)
2. Transferázy (AST, ALT, GGT,CK)
3. Hydrolázy (ALP, LPS, AMS, CHE)
4. Lyázy (NSE)
5. Ligázy (syntetázy)
6. Izomerázy

Faktory ovlivňující enzymovou reakci

1. Teplota (25 - 30 - 37 °C)
2. Pufry (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

reakční rychlost



Inhibice enzymů (snížení aktivity)

Ireverzibilní

- inhibitor pevně vázán na enzym (akt. místo)
- organofosfáty
- ionty těžkých kovů
- kyanidy

Reverzibilní

- inhibitor volně vázán
- rovnováha $E+I \Leftrightarrow E-I$
- inhibitor lze odstranit (dialýza, gel. filtrace)
- dva základní typy:
kompetitivní, nekompetitivní

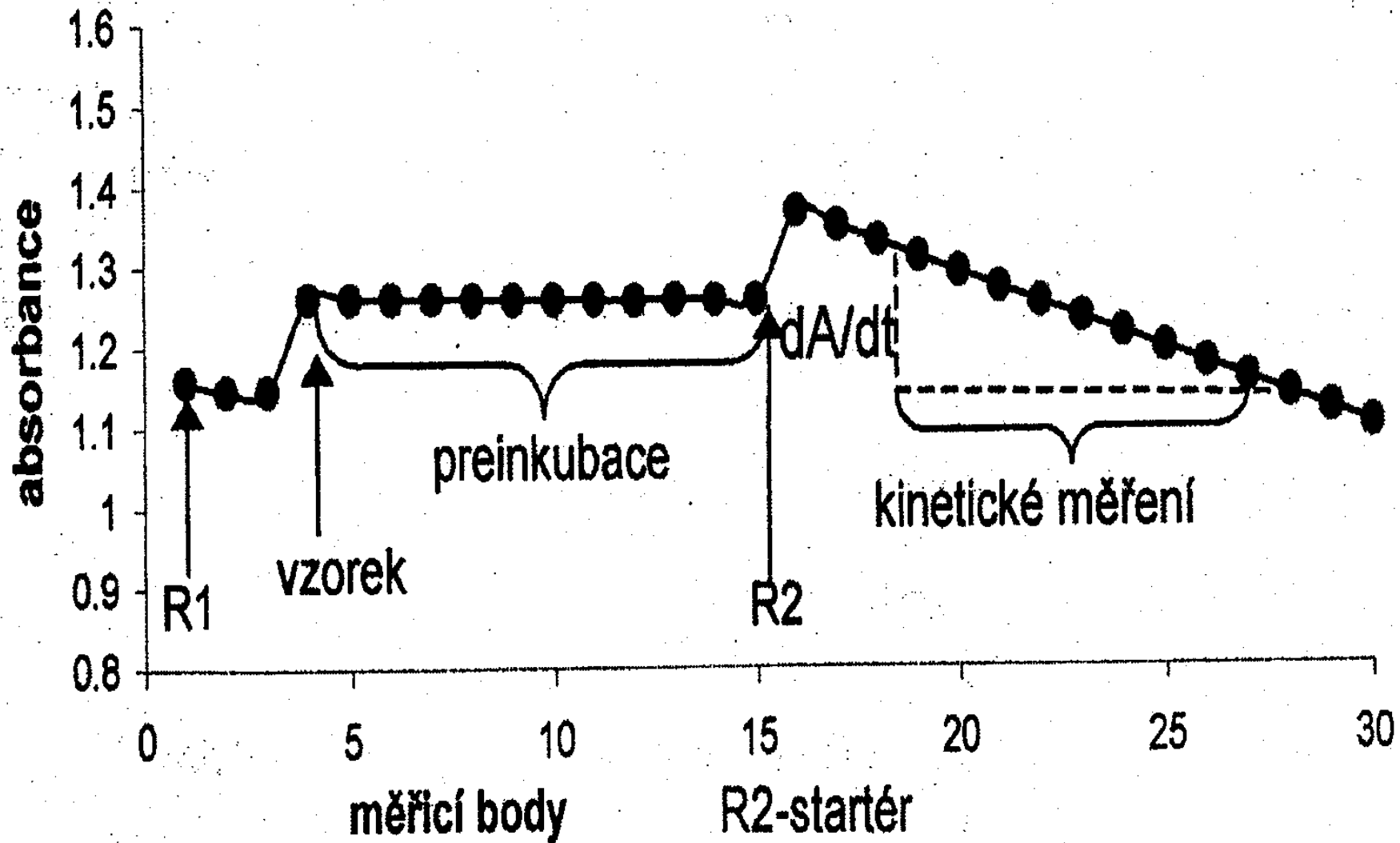
Kompetitivní inhibice

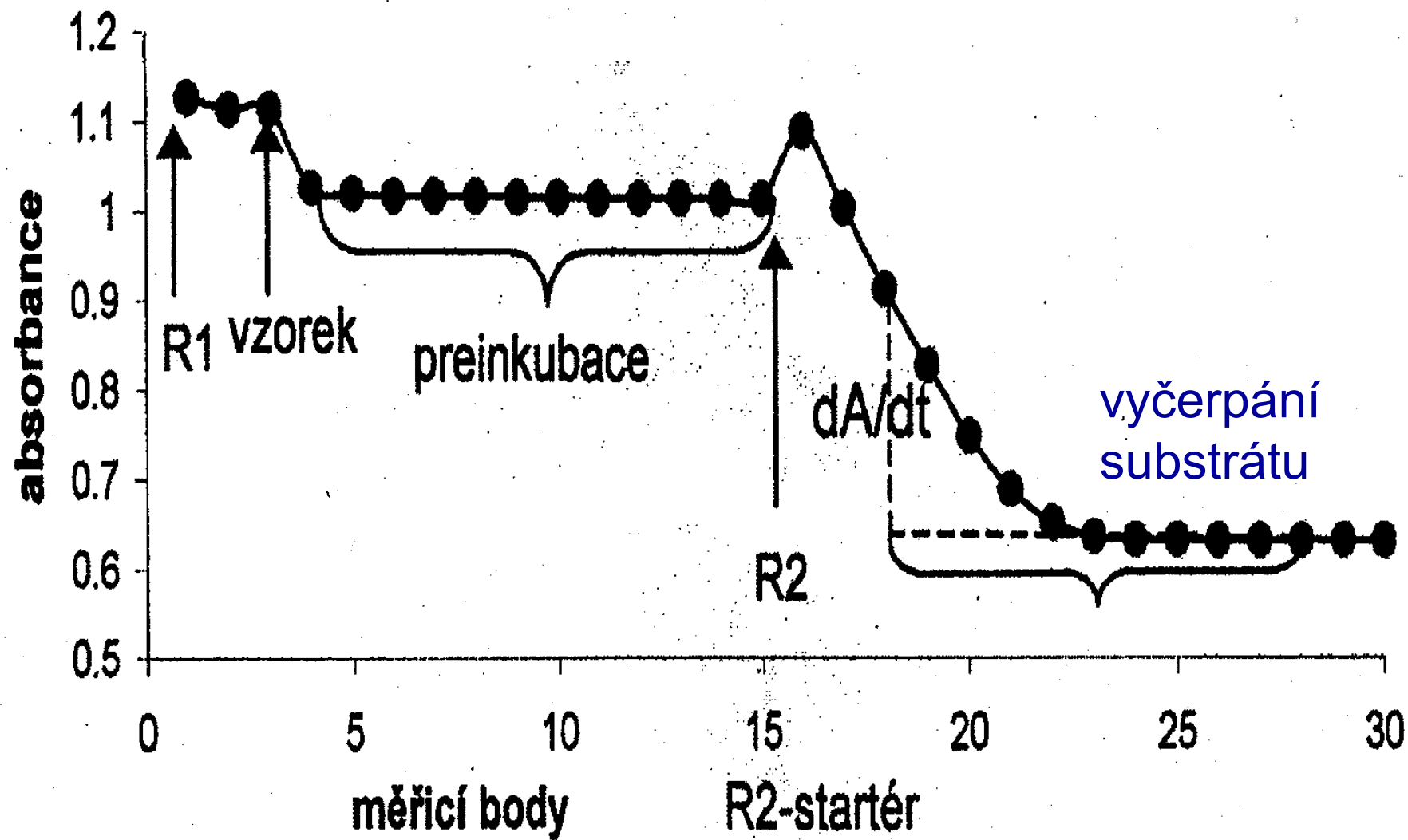
- inhibitor je strukturně podobný substrátu
- váže se do aktivního místa
- soutěží s fyziologickým substrátem o vazebné místo

Nekompetitivní inhibice

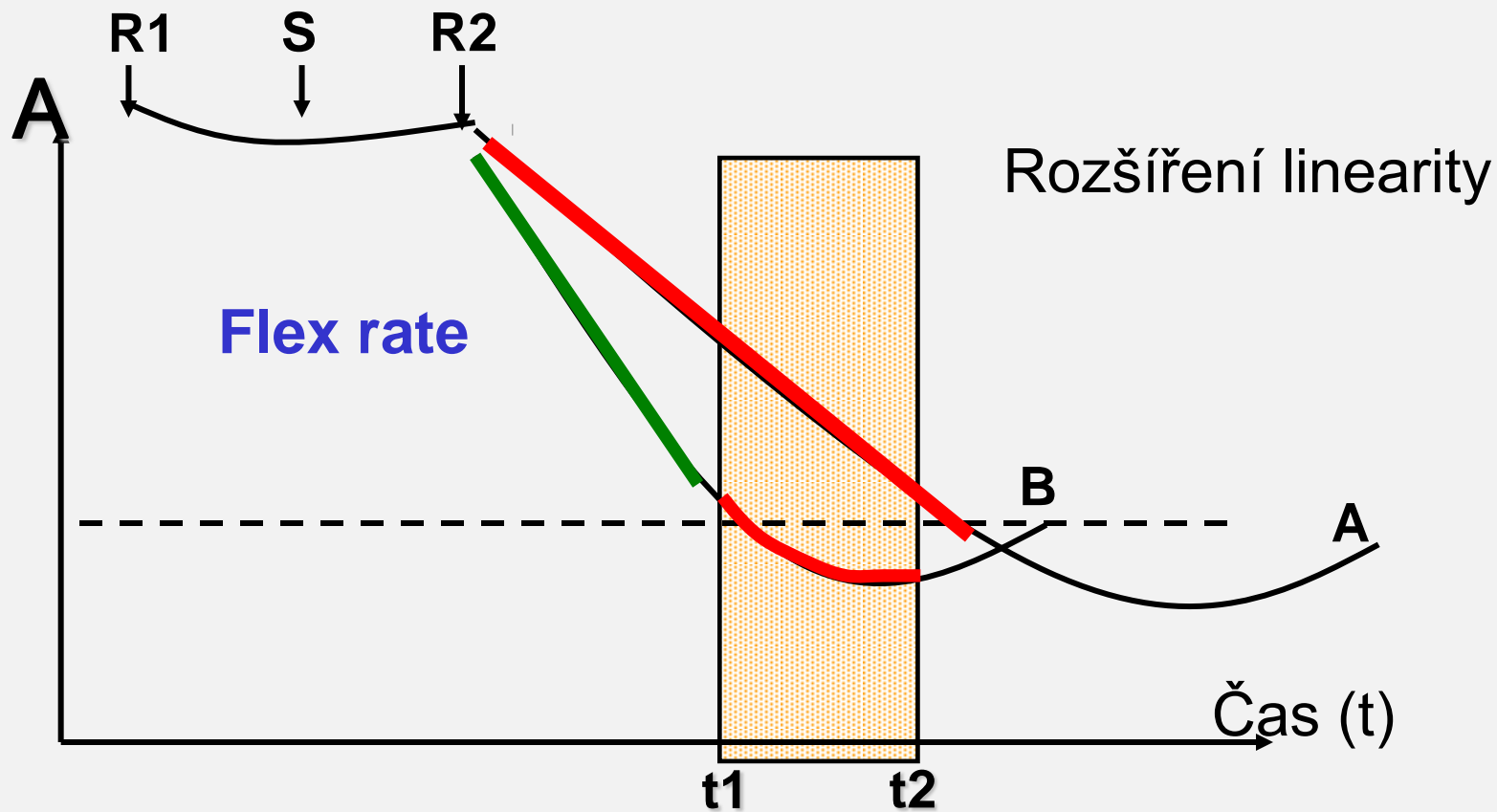
- Inhibitor se váže mimo aktivní centrum na E i na komplex E-S
- V_{\max} se snižuje, protože klesá koncentrace funkčního komplexu E-S

Vliv časového intervalu, ve kterém měříme





Flex rate



IFCC standardizace (+37°C)

- Primární referenční měřicí postupy, SOP
- CRM pro enzymy + sekundární CRM
- Mezinárodní srovnání referenčních laboratoří
- Akreditace kalibračních laboratoří
- Mezinárodní síť referenčních laboratoří
- Společné referenční intervaly a rozhodovací limity

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

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

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

Předběžné referenční hodnoty (metody IFCC)

Tabulka předběžných referenčních hodnot pro stanovení katalytických aktivit rutinních enzymů dle referenčních metod IFCC 2002 (při 37°C) pro dospělé muže a ženy (věk ≥ 17 let)

<i>Enzym</i>	<i>Referenční interval $\pm 90\%$ CI [ukat.l⁻¹]</i>		<i>Počet</i>	
	<i>Muži</i>	<i>Ženy</i>	<i>muži</i>	<i>žen</i>
ALT	$\leq 0,74$ (0,71 – 0,77)	$\leq 0,56$ (0,51 – 0,60)	422	411
AST	$\leq 0,58$ (0,52 – 0,59)	$\leq 0,52$ (0,48 – 0,57)	418	419
CK	$\leq 2,85$ (2,76 – 2,95)	$\leq 2,41$ (2,21 – 2,55)	740	738
γ -GT	$\leq 0,92$ (0,89 – 0,96)	$\leq 0,63$ (0,62 – 0,65)	407	420
LD	$\leq 4,13$ (4,05 – 4,22)	$\leq 4,12$ (4,07 – 4,25)	441	438

AST

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

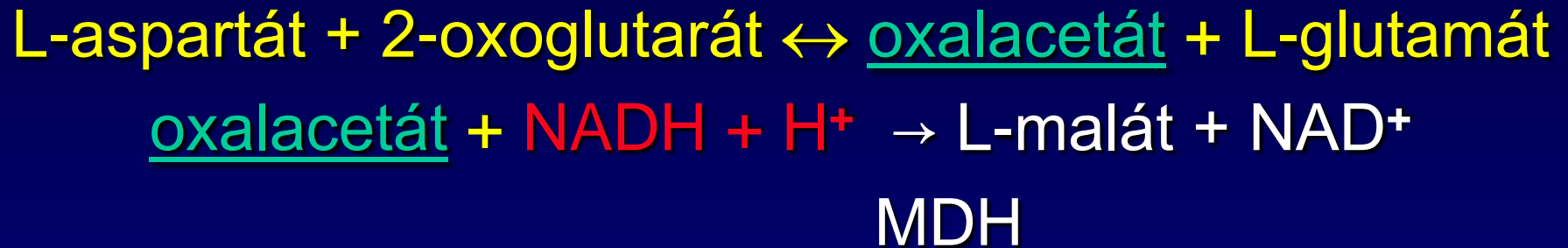
Je obsažena v cytoplasmě(65%) a v mitochondriích(35%) všech buněk (zvláště hepatocytů, buněk srdečního svalu, ledvin a kosterních svalů)

AST

Klinický význam

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

AST

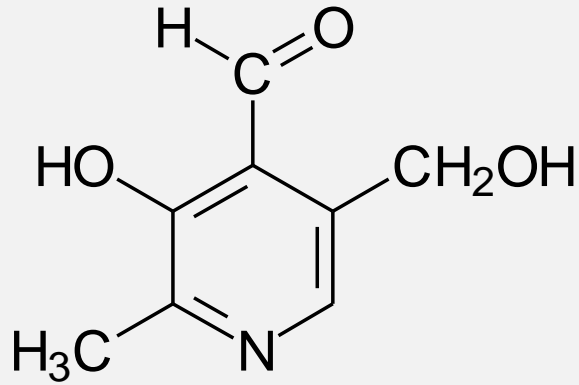


SPEKTROFOTOMETRICKY - pokles absorbance NADH při 340 nm

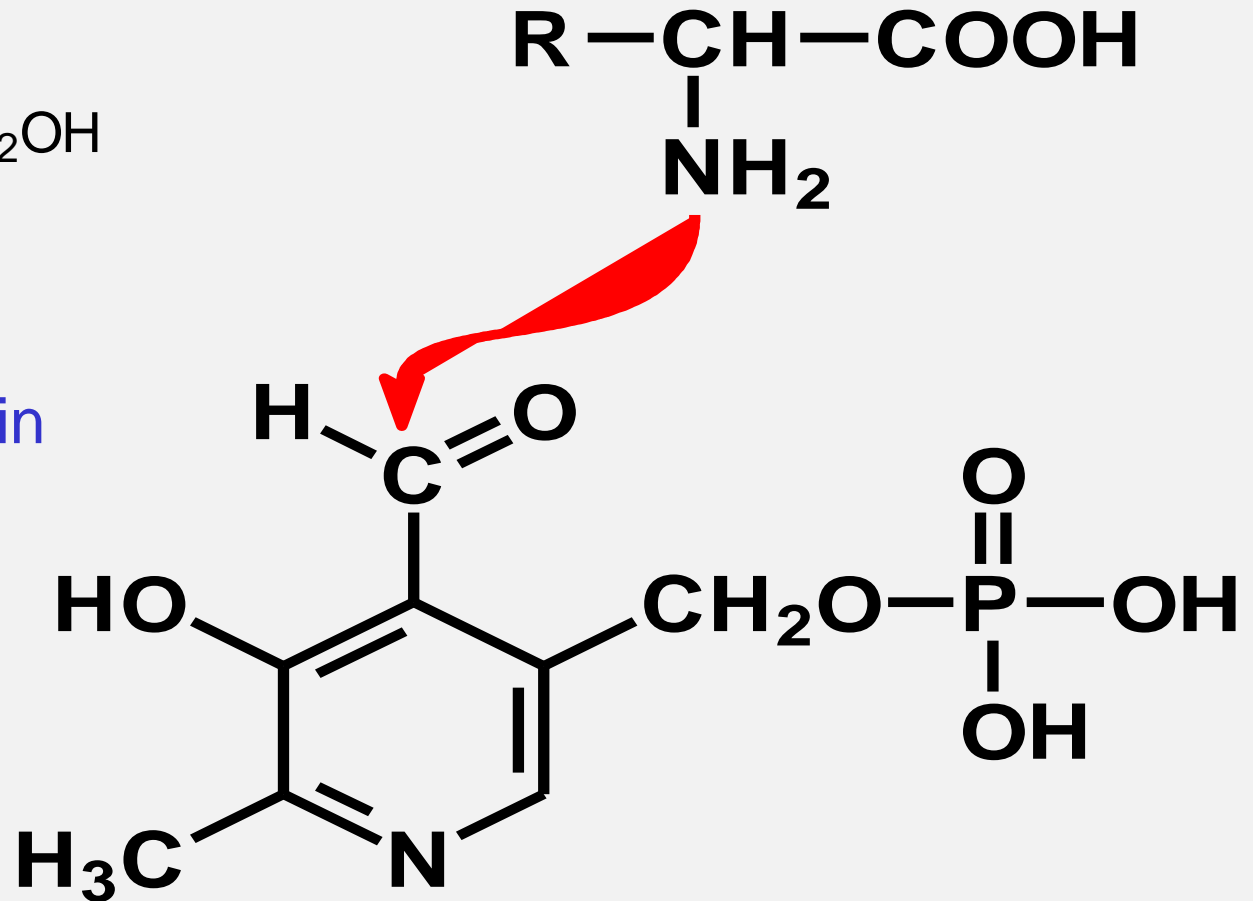
- **pyruvát** + NADH + H⁺ ⇒ L-laktát + NAD⁺
- **koenzym: pyridoxal-5-fosfát** + ApoAST ⇒ AST*
- doporučuje se předinkubace 10 min při +37°C
- start : 2-oxoglutarát (2 činidlová metoda)
- start : sérum (1 činidlová metoda)

Pyridoxalfosfát

je kofaktor transaminací



Pyridoxal = vitamin



ALT

L-alanin + 2-oxoglutarát \Leftrightarrow 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 \Leftrightarrow pyruvát + L-glutamát

pyruvát + NADH + H⁺ \Rightarrow L-laktát + NAD⁺

LD

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

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

AMS

štěpí α -1,4 glykozidické vazby

POLYSACHARIDY \Rightarrow OLIGOSACHARIDY \Rightarrow MALTÓZA

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

Sérum obsahuje přibližně stejnou katalytickou koncentraci pankreatického a slinného izoenzymu.

AMS

Klinický význam

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

Doporučená metoda IFCC

substrát : **EPS-G7-PNP (EPS)**

4,6-ethyliden(G7)-4-nitrofenyl(G1)- α -(1,4)-D-maltoheptaosid

▶ Maltoheptaosid O- O- O- O- O- O- O 7 glukóz

▶ + α -Glukosidáza

▶ substráty značené 4-nitrofenolem na konci molekuly

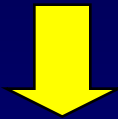


▶ na opačném konci molekuly substrátu navázána např. ethylidenová skupina \Rightarrow „blokovaný“ substrát



1 molekula EPS

4,6-ethyliden(G7)-4-nitrofenyl(G1)- α -(1,4)-D-maltoheptaosidu



7 molekul glukózy + 1 molekula 4-nitrofenolu

SPEKTROFOTOMETRICKY: ABSORBANCE 4-NITROFENOLU
405 nm

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
⇒ způsobuje 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

ALP

monoestery kyseliny o-fosforečné + H₂O



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 + H₂O → 4-NITROFENOL +
fosforečnan

SPEKTROFOTOMETRICKY: ABSORBANCE 4-NITROFENOLU při 405 nm

Izoenzymy ALP

1. **Imunochemicky** (kostní izoALP)
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: IFCC (37°C)



HEXOKINASA



G6PD

SPEKTROFOTOMETRICKY -nárůst absorbance NADPH při 340 nm

Reaktivace: 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

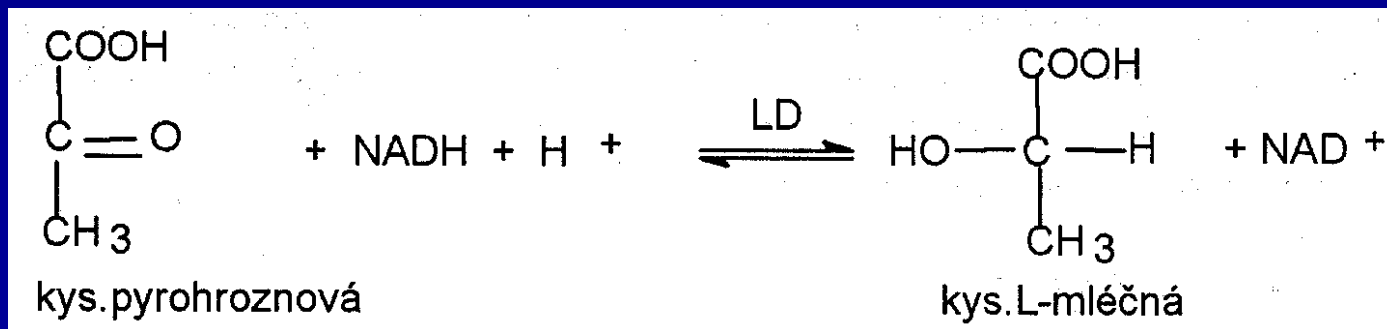


LD

- 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:

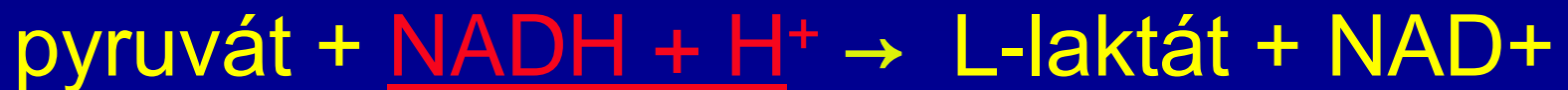
1. IFCC (37°C)

Substrát: L-laktát



SPEKTROFOTOMETRICKY -nárůst absorbance NADH při 340 nm

2. Substrát: pyruvát



SPEKTROFOTOMETRICKY -pokles absorbance NADH při 340 nm

Izoenzymy LD

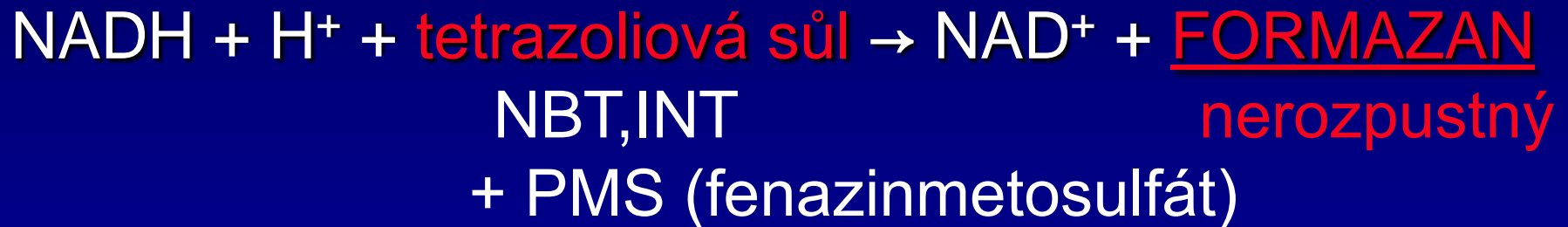
- Aktivní enzym je tetramér - skládá se ze 4 podjednotek
- Existují 2 druhy podjednotek:
M(muscle/sval) a H (heart/srdce)
- Kombinací vzniká 5 izoenzymů :

LD1	H4
LD2	H3M
LD3	H2M2
LD4	HM3
LD5	M4

Izoenzymy LD



Detekce elektroforeogramu



GGT

Katalyzuje přenos γ -glutamylového zbytku z γ -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:

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



Glygly = GLYCYLGLYCIN

LPS

TRI- a DIACYLGLYCEROLY + H₂O → GLYCEROL + 3-,2 MK

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

Klinický význam:

- detekce a vyloučení akutní pankreatitidy
(4-6 h, maximum 24h, 8-14 d normalizace)
- chronická pankreatitida (relapsující)
- obstrukce pankreatického traktu

1. TURBIDIMETRICKÉ:

štěpení emulze trioleinu lipasou za přítomnosti kolipasy a deoxycholanu, měří se úbytek absorbance (snížení zákalu) při 340 nm (UV-oblast)

KOLIPASA je protein secernovaný z pankreatu, váže se s lipasou 1:1 ke žlučovým kyselinám na povrchu emulgovaných kapének TG, umožňuje štěpení TG působením lipasy

2. Chromogenní

štěpení syntetických substrátů

a) substrát : 1,2-DIGLYCERID

1,2-diglycerid + H₂O → 2-monoglycerid + mastná kyselina

2-monoglycerid + H₂O → **glycerol** + mastná kyselina

glycerol + ATP → glycerol-3-fosfát + ADP

Glycerol-3-fosfát + O₂ → dihydroxyacetonfosfát + **H₂O₂**

2 H₂O₂ + 4-AAP + deriv.fenolu → 4 H₂O + **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

CHE

hydrolýza

estery CHOLINU + H₂O → CHOLIN + příslušná kyselina

- **Acetylcholinesterázy**



je obsažena v erythrocytech, 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 + H₂O → thiocholin + butyrát

thiocholin + DTNB ⇒ 5-merkapto-2-nitrobenzoová kyselina

žluté zbarvení

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

Metody stanovení:



Enzymy v moči

1. AMS

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

TUBULÁRNÍ postižení LEDVIN

Enzymy -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