

Enzymy a Isoenzymy

Principy metod a klinický význam

Petr Breinek

breinek@seznam.cz

Literatura

- Doporučení odborných společností
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 sprue (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 ( pdf ke stažení)
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.  PDF ke stažení

➤ Jiné zdroje - www.labtestonline.cz

DOMŮ  AU  DE  ES  GR  HU  IT  PL  UK  US 

Lab Tests Online^{CZ}

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



ALT

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

poslat stránku e-mailem
vytisknout stránku

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

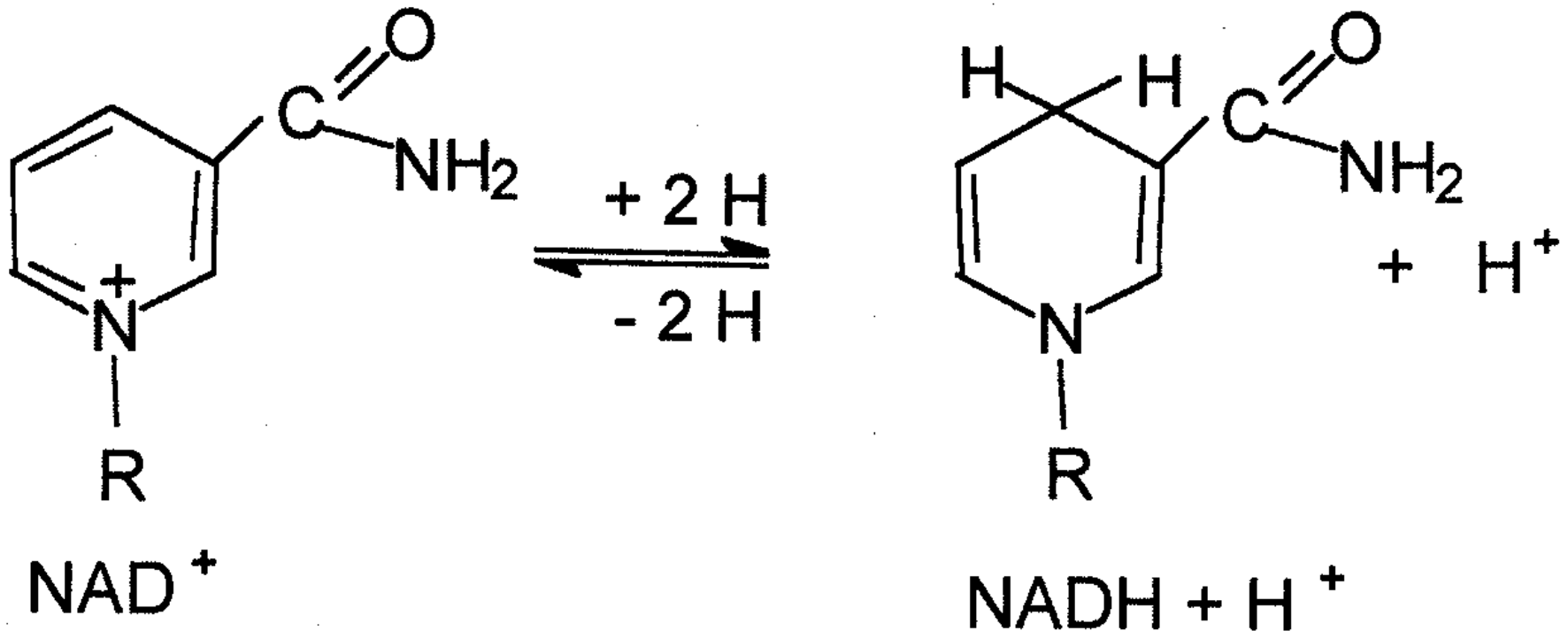
▶ Imunoanalytické metody

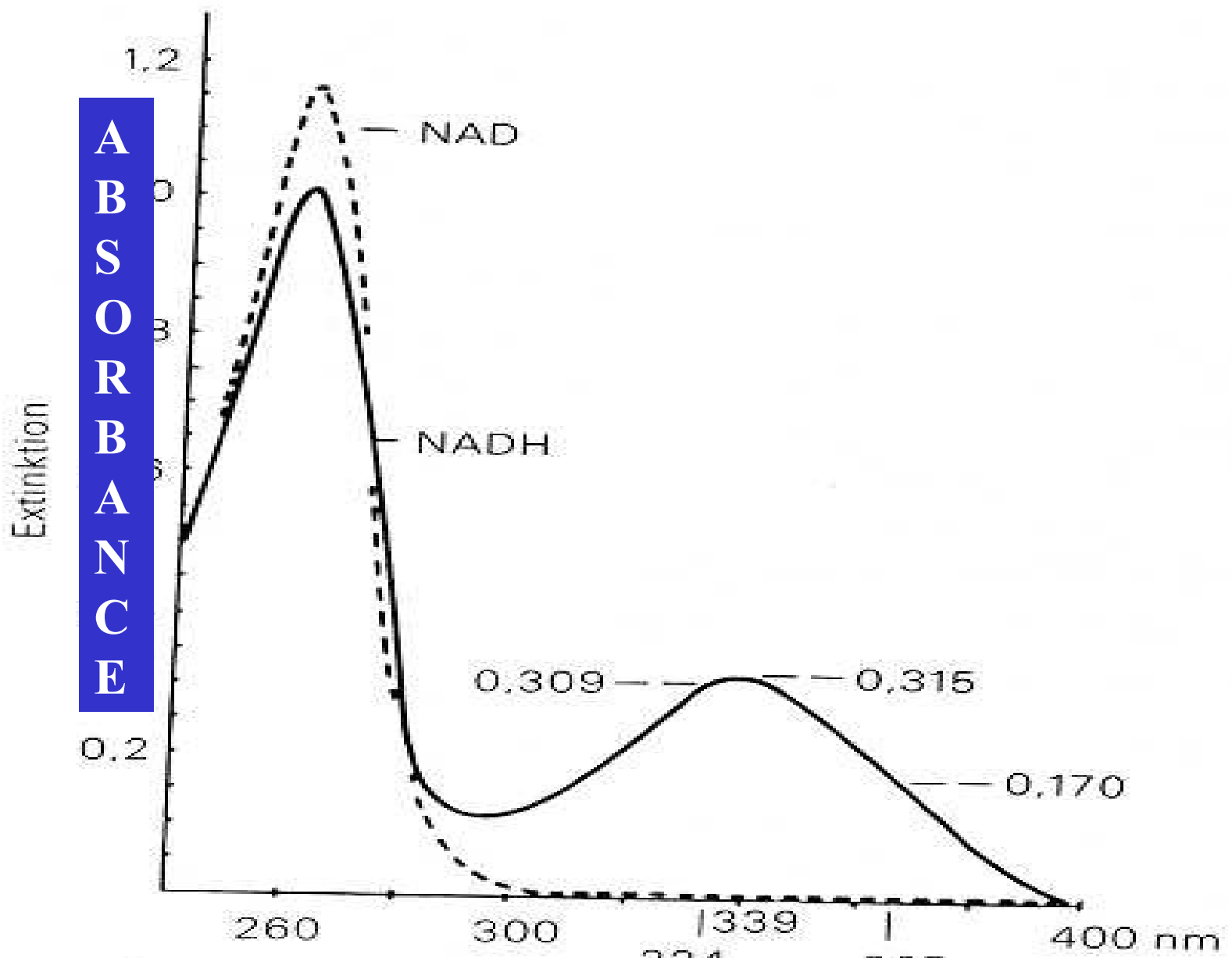
Kinetické měřicí postupy

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

Optický test

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





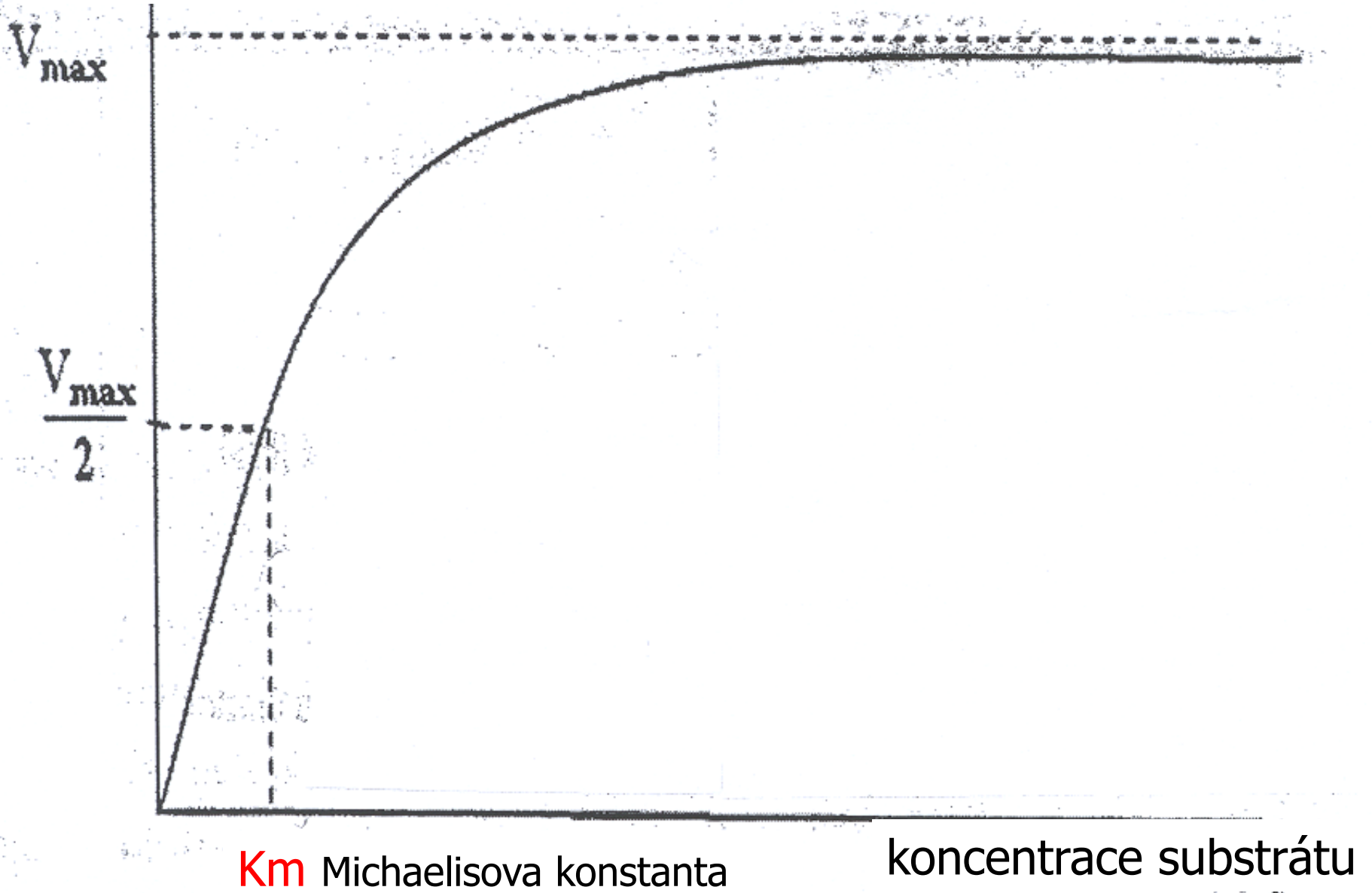
ABSORBANCE

VLNOVÁ DÉLKA

Vyjadřování výsledků měření

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

reakční rychlost

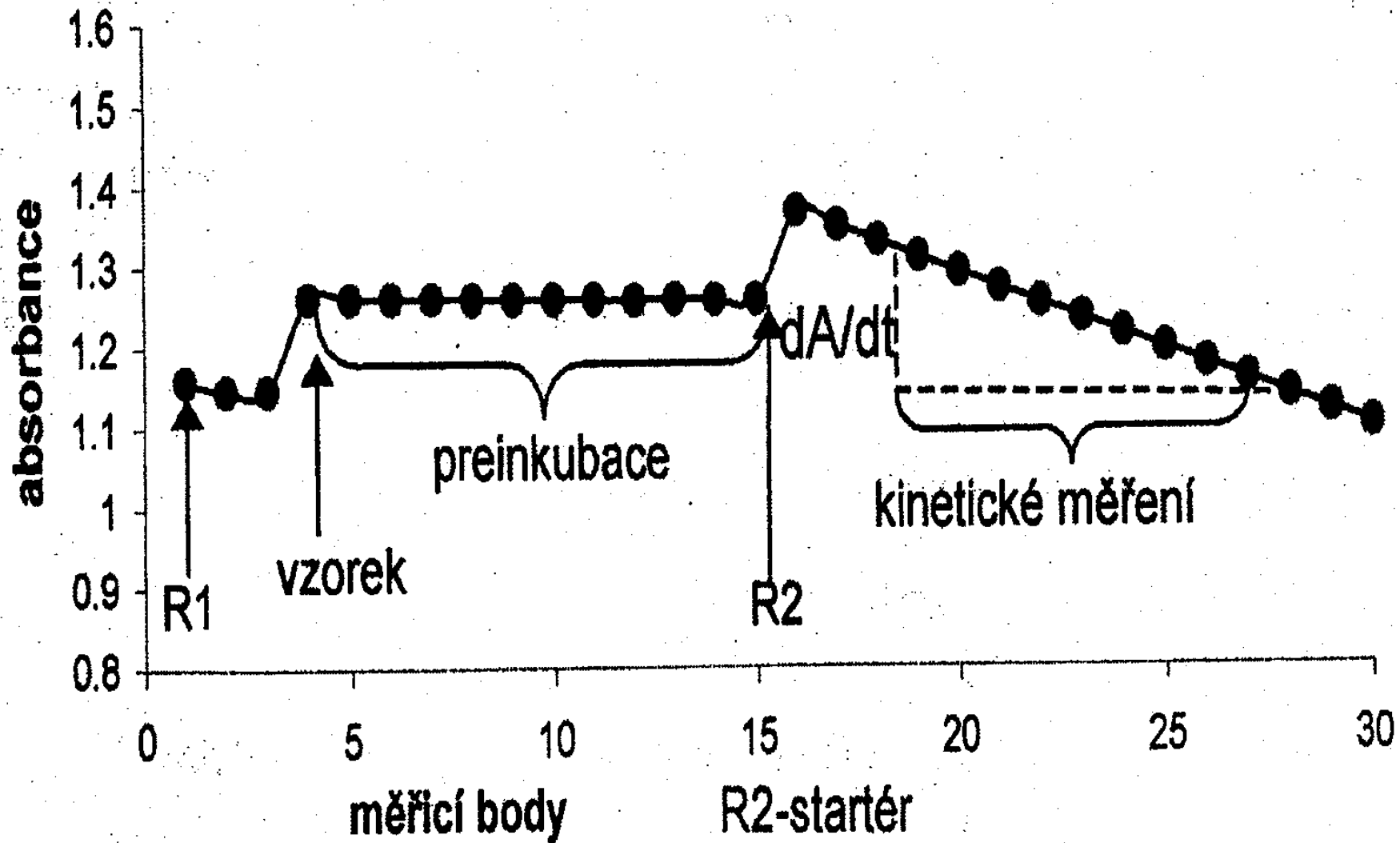


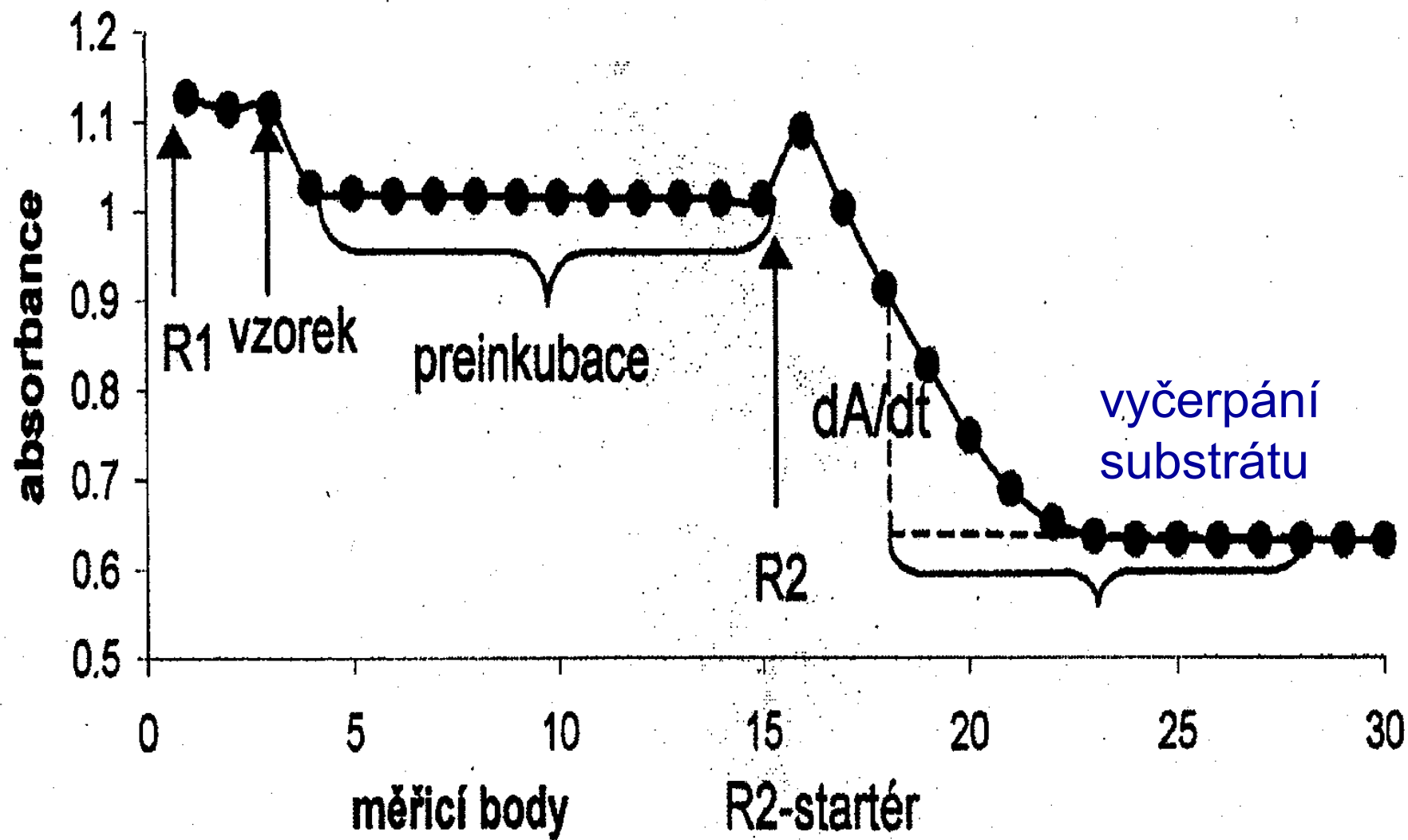
Faktory ovlivňující enzymovou reakci

1. Teplota (25 - 30 - 37 °C)
2. 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

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

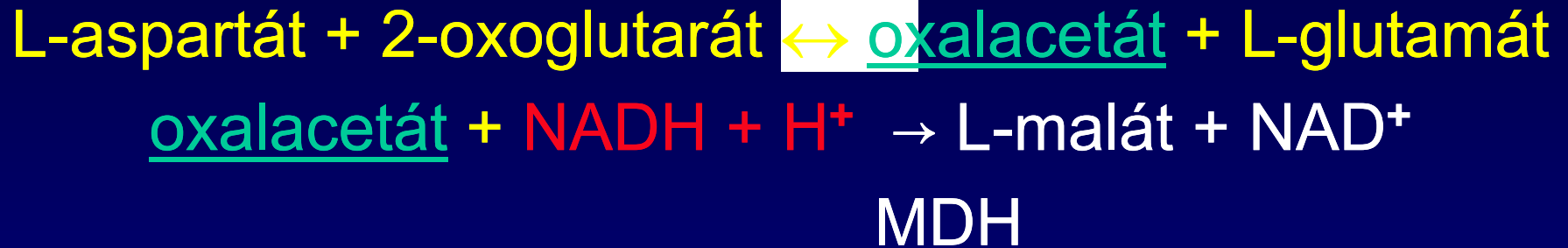
Je obsažena v cytoplasmě(65%) a v mitochondriích(35%) všech buněk (zvláště hepatocytů, buněk srdečního svalu, ledvin a kosterních svalů)

AST

Klinický význam

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

AST



SPEKTROFOTOMETRICKY - pokles absorbance NADH při 340 nm

- **pyruvát** + NADH + H⁺ ████████ 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)

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⁺ \rightleftharpoons \square -laktát + NAD⁺

LD

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

- pyruvát + NADH + H⁺ \rightleftharpoons \square -laktát + NAD⁺
- **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)- α -(1,4)-D-maltoheptaosid

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

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 + H₂O → 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 + 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

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

- 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)

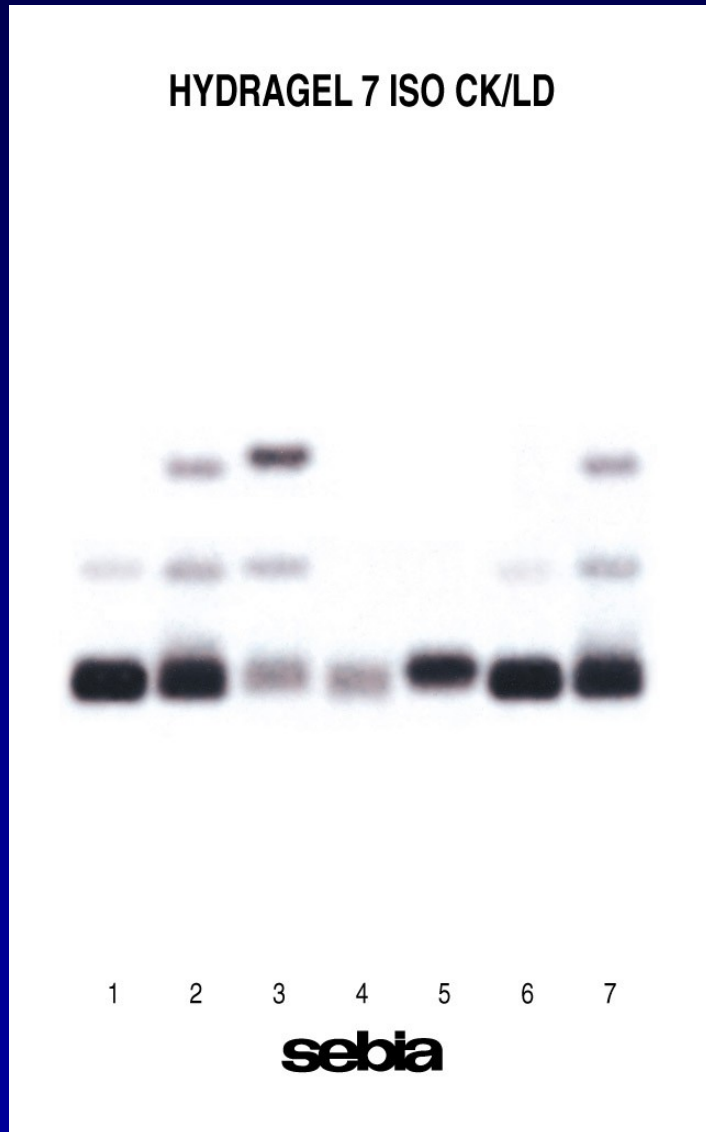
potom: pokud CK-BB = 0 (nepřítomen)

a CK-MM = 0 (inhibice)

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

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

Izoenzymy CK

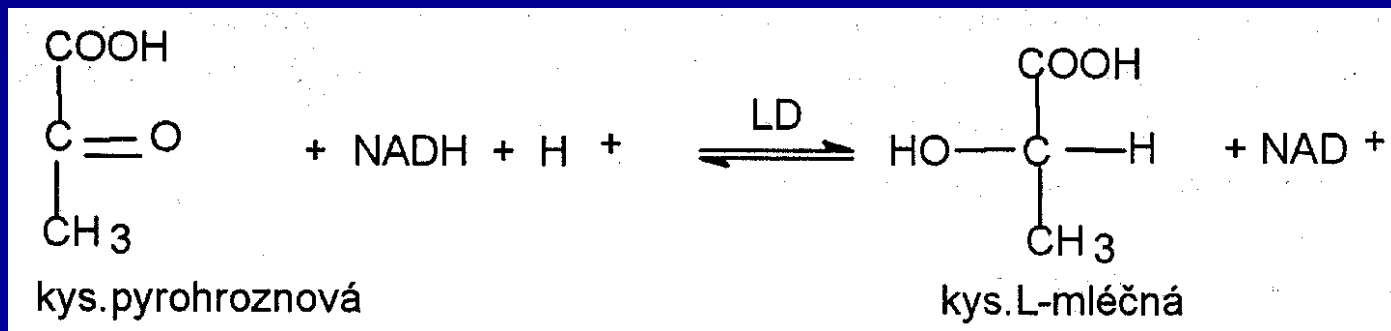


LD

- 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:

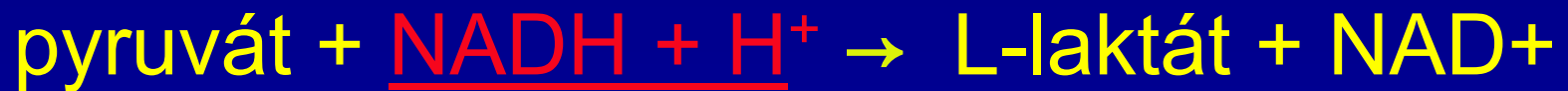
1. IFCC (37 C)

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 γ -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 + 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:

acetylthiocholin + H₂O → 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