

Enzymy a Izoenzymy

Analytika

Principy metod a klinický význam

Petr Breinek



Enzymy - úvod

enzymé „ v kvasinkách“

1926 J.Sumner: ureasa (bílkovinná povaha)

1 buňka živých organismů obsahuje až 3000 druhů enzymů

- **Biokatalyzátory**(bílkoviny/makromolekuly,katalyzátory)
- **Snižují aktivační energii** potřebnou pro chemickou reakci - **urychlují reakce**
- Účinnost je o mnoho řádů vyšší než u jiných katalyzátorů
Kdyby reakce v biologických systémech nebyly katalyzovány enzymy, byly by tak pomalé, že by nemohly zajistit existenci živé hmoty

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!

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**



Enzymatická reakce probíhá v několika stupních

- Tvorba komplexu enzym-substrát: $E + S \leftrightarrow ES$
- Aktivace komplexu ES: $ES \leftrightarrow ES^*$
- Chemická přeměna substrátu, přičemž vzniká komplex enzym-produkt: $ES^* \leftrightarrow EP$
- Oddělení enzymu od reakčního produktu:
 $EP \leftrightarrow E + P$

Aktivní (katalytické) centrum enzymu

- Skupina atomů na povrchu molekuly enzymu, na které se váže substrát
- Nejčastěji několik zbytků aminokyselin s reaktivními skupinami ve vedlejších řetězcích
- Vytváří prostorové a vazebné podmínky pro navázání substrátu a jeho aktivaci pro určitou reakci
- Vazba aktivního centra na substrát je vysoce specifická
- U mnoha enzymů nestačí samotné aktivní centrum pro vazbu substrátu, substrát se váže i prostřednictvím koenzymu

Základní pojmy

- Reakce: $S \longrightarrow P$ (S = substrát, P = produkt)
- Definice reakční rychlosti:

$$v = -\frac{\Delta[S]}{\Delta t} = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} > 0 \quad \left[\frac{\text{mol}}{\text{l.s}} \right]$$

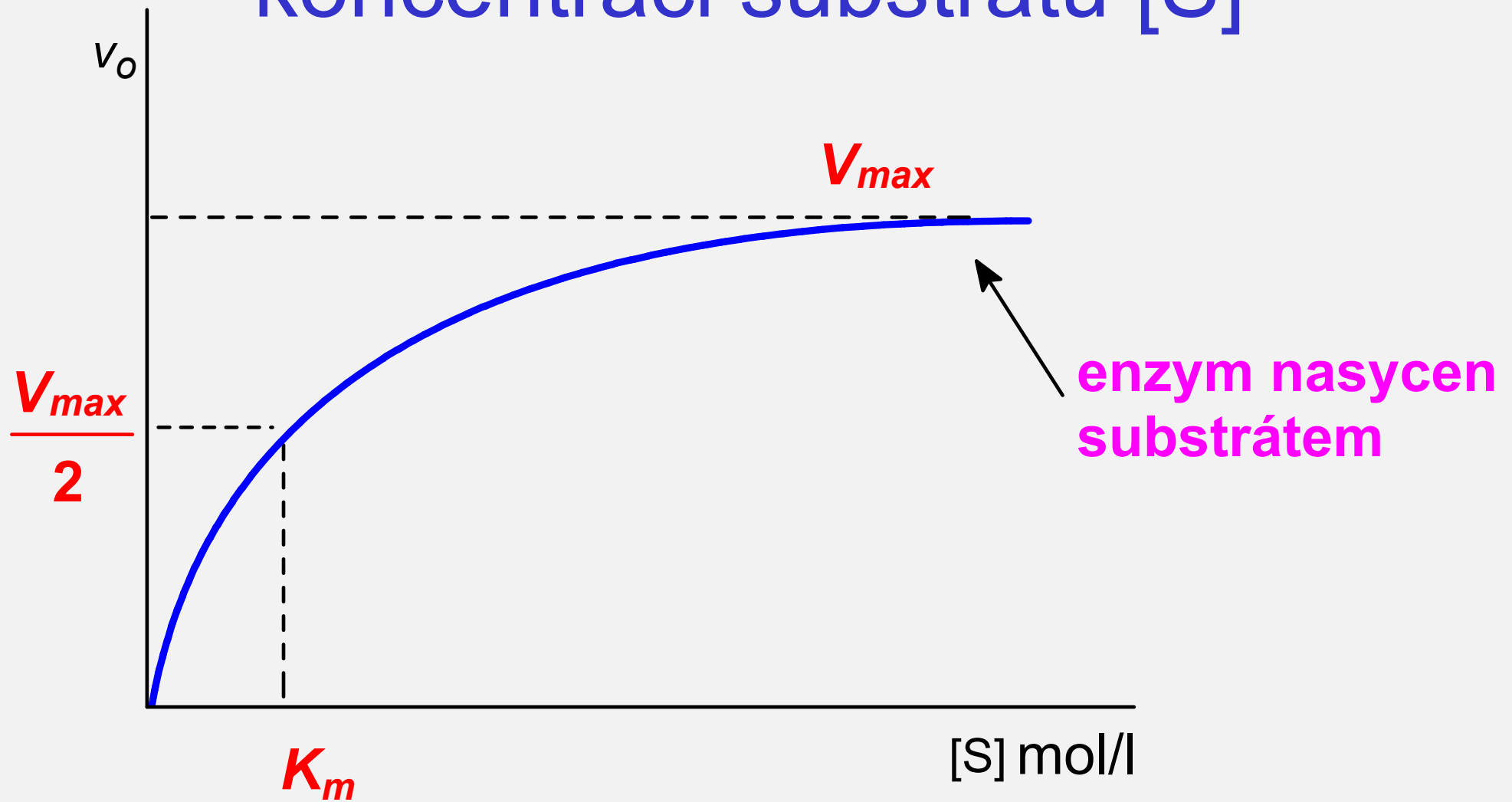
Faktory ovlivňující enzymovou reakci

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

Na čem závisí rychlost reakce?

- Na koncentraci substrátu
- Na teplotě
- Na přítomnosti efektoru (aktivátoru, inhibitoru)

Závislost reakční rychlosti (v_o) na koncentraci substrátu [S]



Při nízkých koncentracích substrátu se reakce řídí kinetikou 1. řádu

Při vysokých koncentracích substrátu se reakce řídí kinetikou 0. řádu

Složení enzymové molekuly

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

Kofaktor:

- **Prostetická skupina** (Mg^{2+} , Zn^{2+} , organické látky ve formě vitaminů,...): pevně vázaná
- **Koenzym** (NAD^+ , P5P): vázán slabě /disociovatelná molekula

Metaloenzymy

- Obsahují **funkční** kovové ionty, které se přímo účastní katalyzované reakce, ionty kovu vázány poměrně pevně
- Některé enzymy potřebují ionty kovů pouze k **aktivaci**, v tom případě jsou vázány slabě, ionty dvojmocných kovů, Ca^{2+} (koagulační faktory), Mg^{2+} (kinázy),...

Kofaktory enzymů

- Nízkomolekulární neproteinové sloučeniny
- Přenášejí 2H nebo e^- → oxidoreduktázy
- Přenášejí skupiny → transferázy
- Pevně vázané - prostetická skupina
- Volně vázané - koenzymy

Vitaminy a kofaktory oxidoreduktáz

Vitamin	Kofaktor	Funkce kofaktoru
Nikotinamid	NAD ⁺	akceptor 2H
Nikotinamid	NADPH + H ⁺	donor 2H
Riboflavin	FAD	akceptor 2H
-----	tetrahydrobiopterin	donor 2H
-----	molybdopterin	přenos elektronů
-----	lipoát	akceptor 2H
-----	ubichinon	přenos 2 elektronů (a 2H ⁺)
-----	hem cytochromů	přenos 1 elektronu
-----	nehemové Fe a S	přenos 1 elektronu
-----	2 GSH	donor 2H

Kofaktory oxidoreduktáz vždy
existují ve dvou formách

oxidovaná \rightleftharpoons redukováná

tvoří redoxní pár

Vitaminy a kofaktory transferáz

Vitamin	Kofaktor	Přenášená skupina
---	ATP	$-\text{PO}_3^{2-}$
---	PAPS	$-\text{SO}_3^{2-}$
Listová kyselina	H_4 -folát	C_1 skupiny
Biotin	karboxybiotin	CO_2
Thiamin	thiamindifosfát	aldehydová
Pyridoxin	pyridoxalfosfát	$-\text{NH}_2$
Pantothenová kyselina	CoA-SH	acyl
---	dihydrolipoát	acyl
[Methionin]	SAM	$-\text{CH}_3$
Kyanokobalamin	methylkobalamin	$-\text{CH}_3$

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

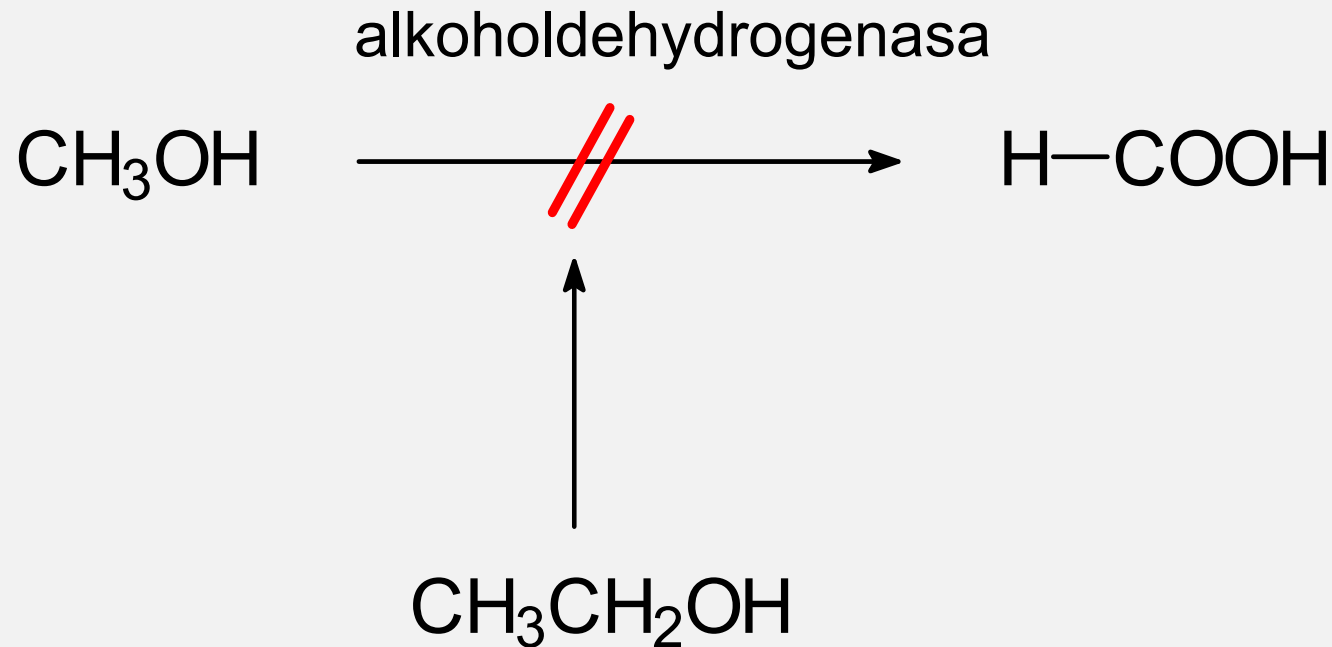
nekompetitivní

Kompetitivní inhibice

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

Příklad:

Otrava methanolem se léčí ethanolem



Enzym je kompetitivně inhibován netoxickým substrátem na úkor toxického substrátu

Nekompetitivní inhibice

- Inhibitor se váže mimo aktivní centrum na E i na komplex E-S
- K_m se nemění (aktivní místo je volné pro substrát)
- V_{max} se snižuje, protože klesá koncentrace funkčního komplexu E-S

Příklad: léky

- Mnohá léčiva jsou inhibitory enzymů
- Statiny (HMG-CoA reductáza) – hypolipidemika, snižují syntézu cholesterolu (lovastatin)
- Inhibitory ACE (angiotensin konvertující enzym) – léčba hypertenze (enalapril)
- Antibiotika inhibují enzymy nutné pro určitý životní děj bakterií
- Peniciliny – inhibují transpeptidázy (výstavba buněčné stěny)
- Tetracykliny, makrolidy, chloramfenikol – inhibice proteosyntézy

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

Množství enzymu v biologickém materiálu Ize 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

Metody stanovení katalytické koncentrace aktivity enzymu

Kinetické

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

Konstantního času

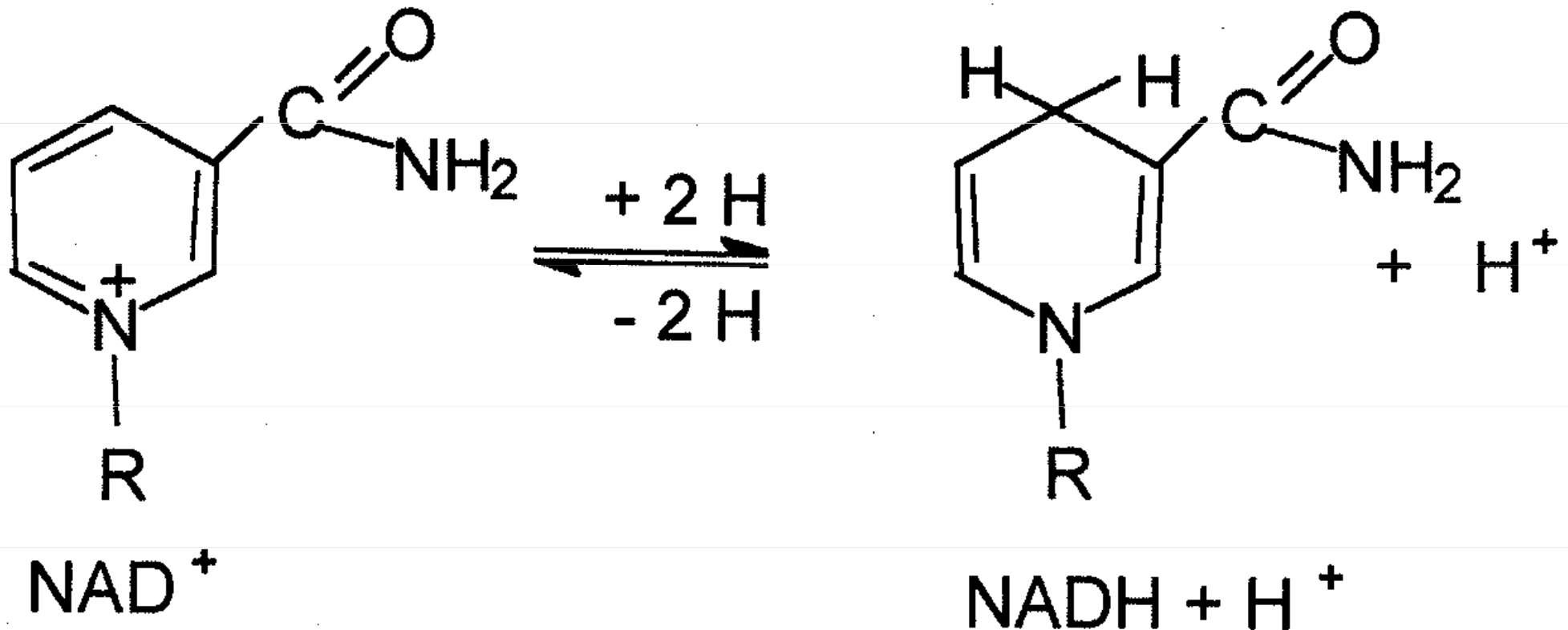
- „dvoubodov
- „end-point“

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

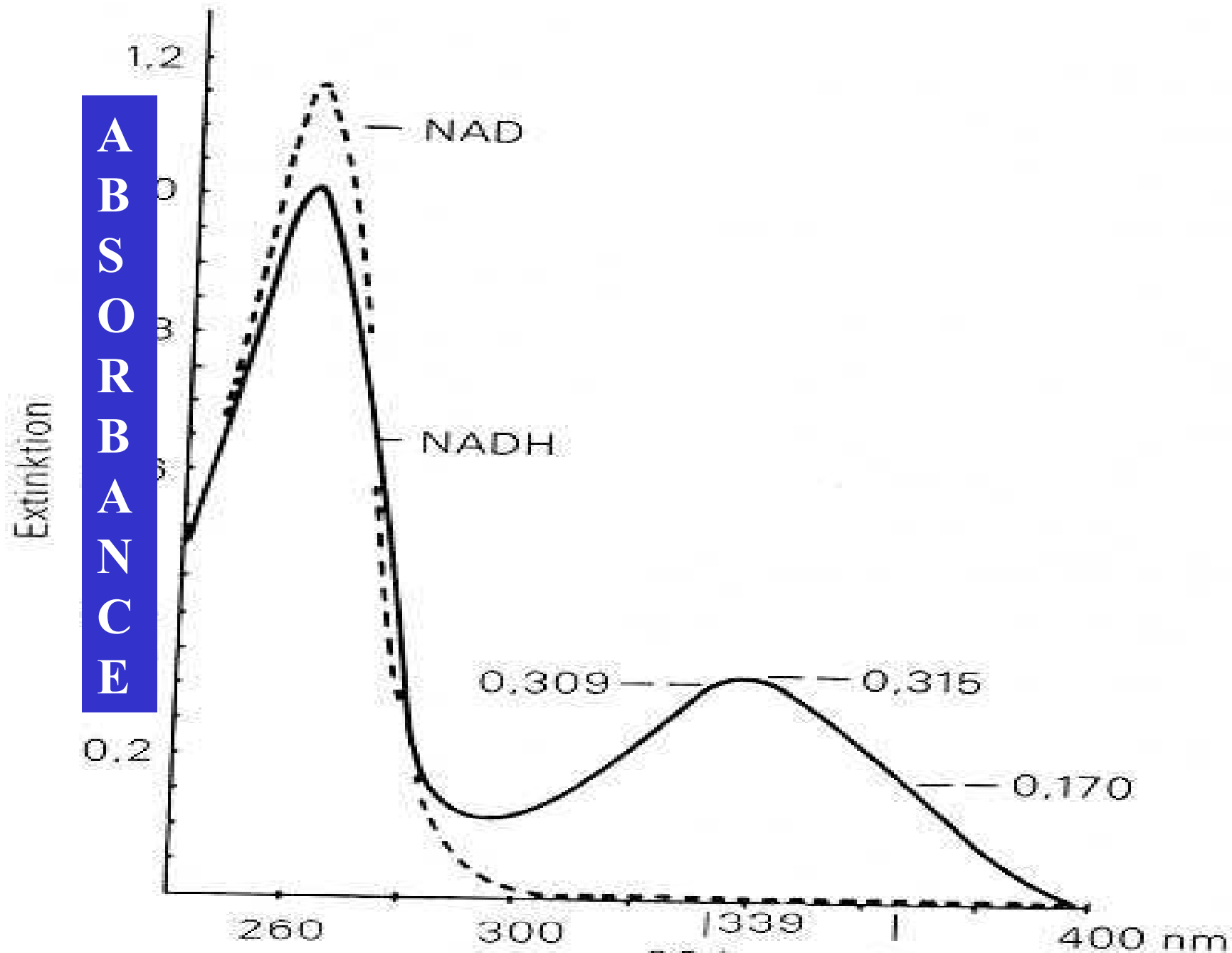
- Měří se [P] po proběhnutí reakce
- Jedno měření
- **nedoporučovány**

Optický test

měříme změny absorbance v UV-oblasti
(při 340 nm) způsobené změnami koncentrace
redukováných forem koenzymů $\text{NADH} + \text{H}^+$
nebo $\text{NADPH} + \text{H}^+$



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

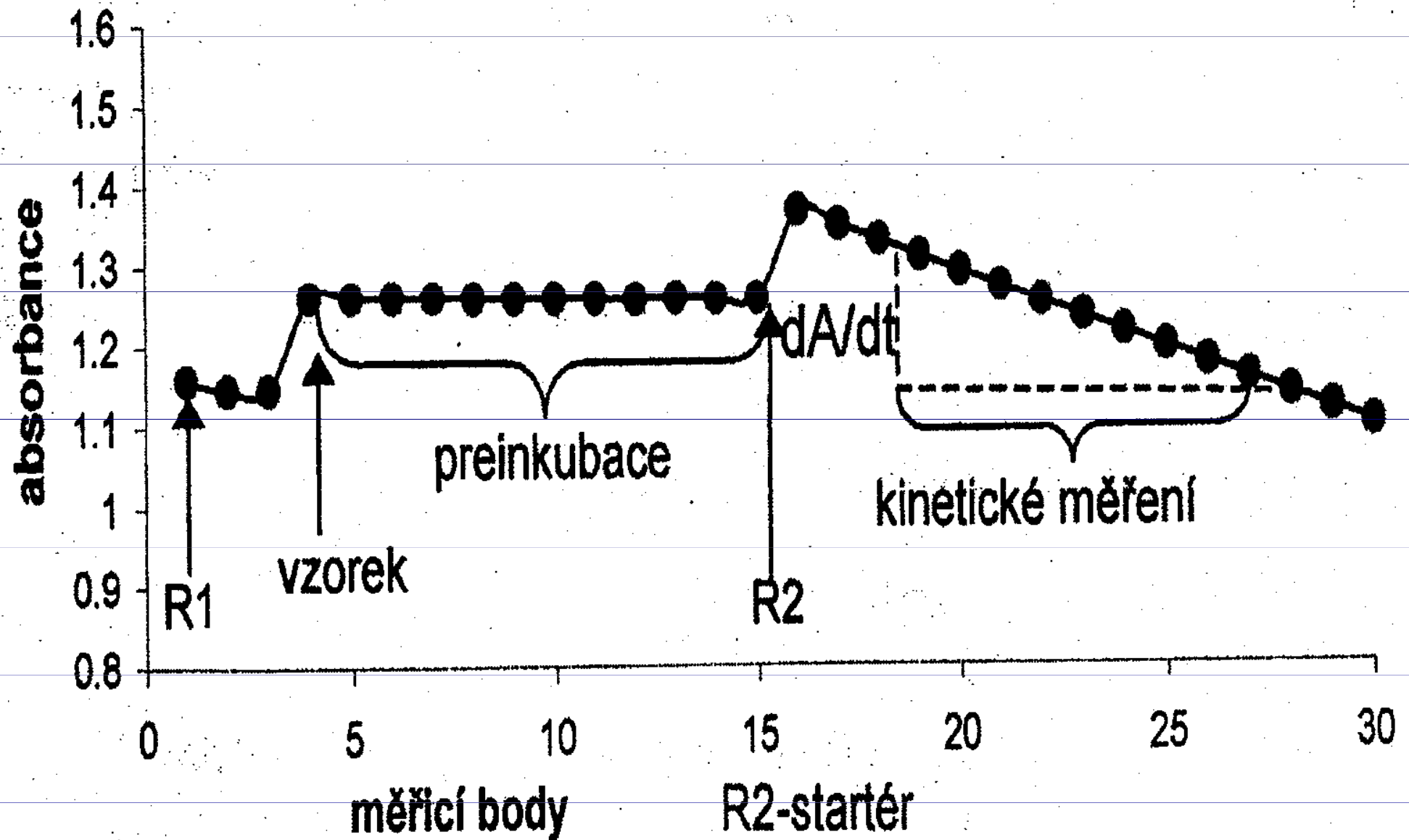


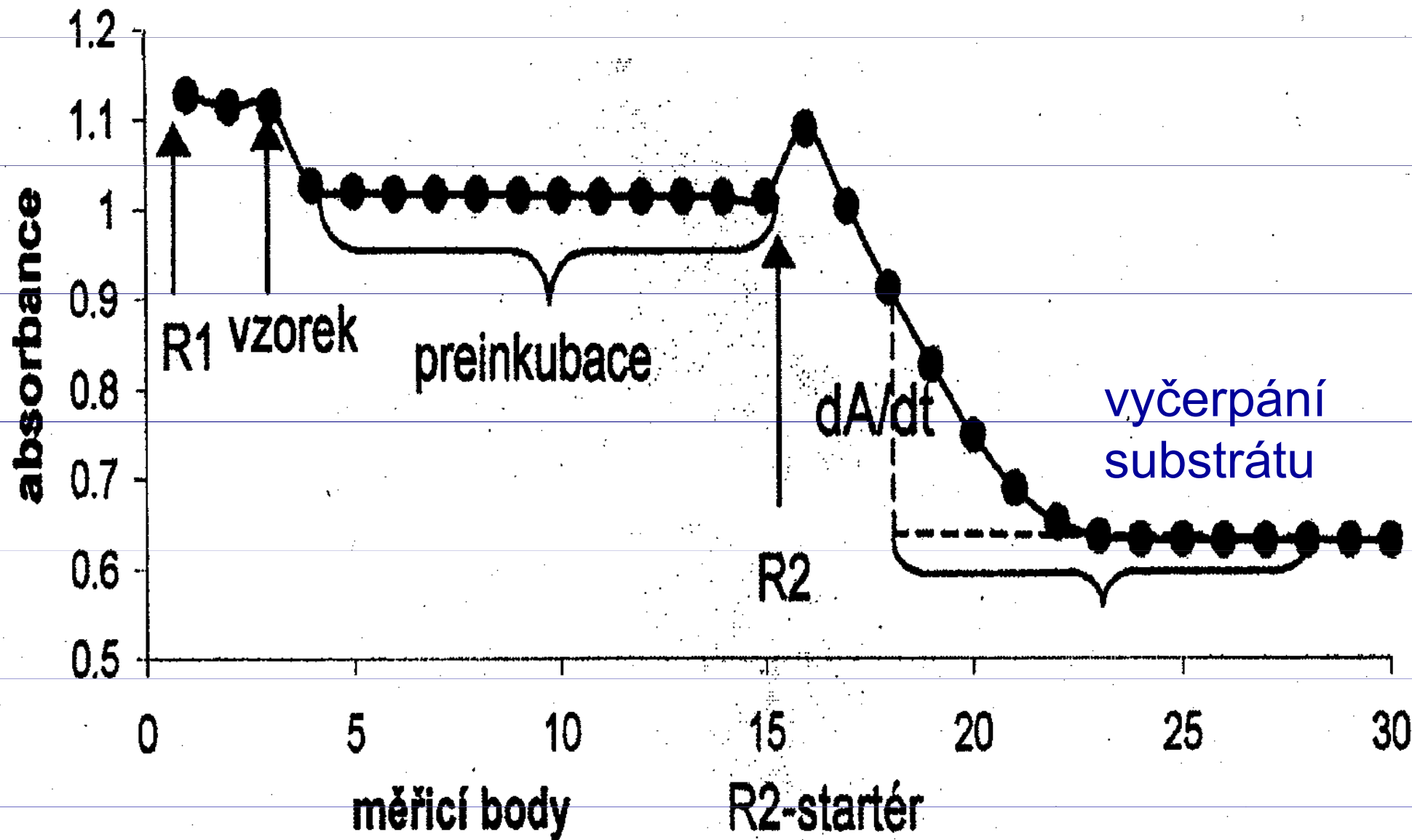
VLNOVÁ DÉLKA

Stanovení katalytické koncentrace aktivity enzymu

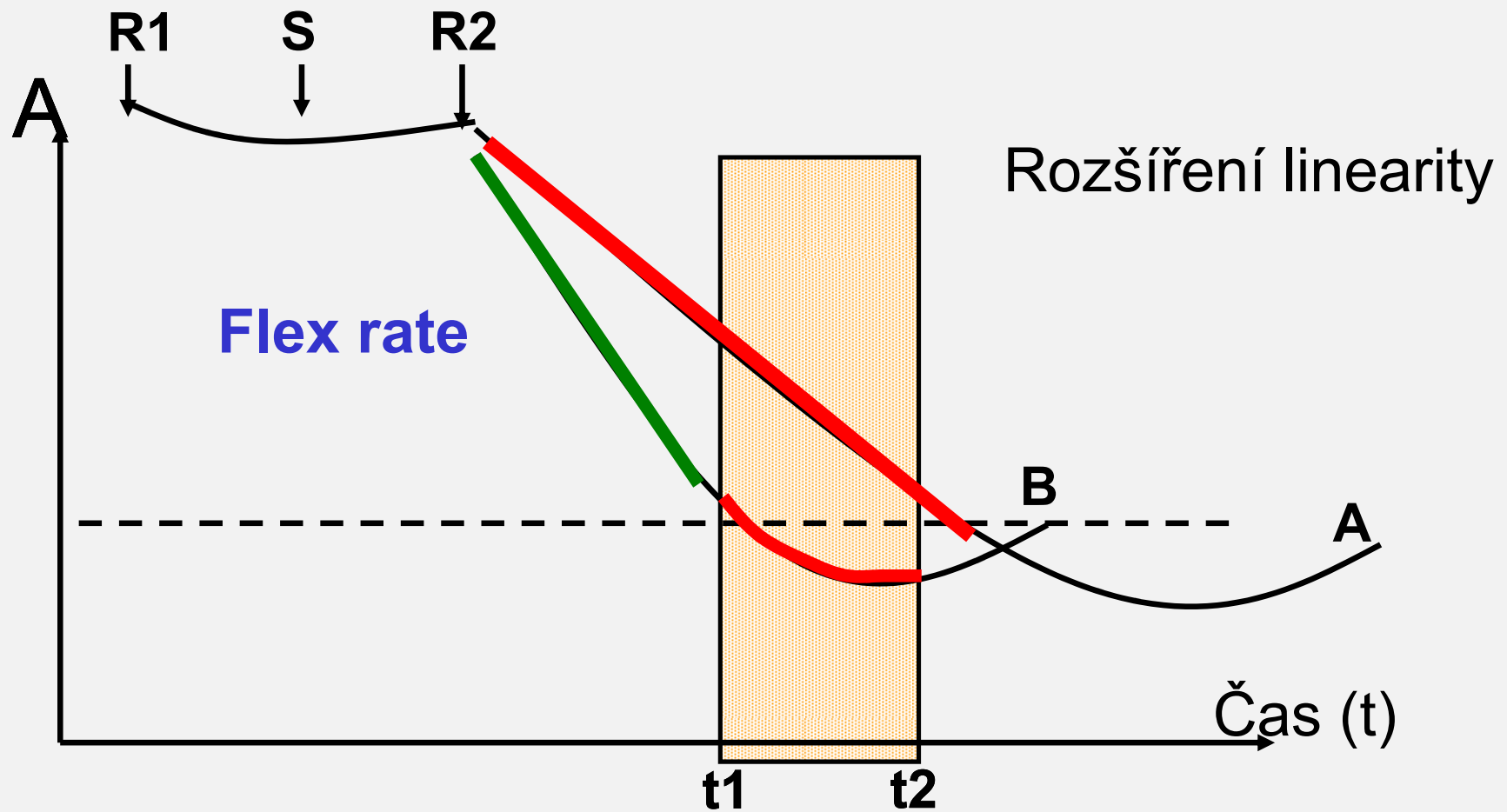
- Optimální podmínky (teplota, pH, kofaktory)
- Měří se $\Delta[S]$ nebo $\Delta[P]$ v určitém časovém intervalu
- **Kinetika 0. řádu, $[S] \gg K_m \Rightarrow$ nasycený enzym, rychlost je konstantní, blíží se V_{max}**

Vliv časového intervalu, ve kterém měříme





Flex rate



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

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

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

Jaká je povolená chyba v EHK?

Enzym	TMU (SEKK 2011)	TMU teoretické
ALP	21%	12%
AMS	15%	15%
AST	15%	15%
ALT	15%	32%
CK	21%	30%
GGT	20%	22%
LD	21%	11%
LPS	24%	29%
CHS	21%	8,9%
PAMS	21%	18%
ACPP	21%	
CKMB mass	30%	

Jak se získávají cílové hodnoty?

- **Referenčními metodami / postupy**

RMP Reference Method Procedure

- **Validovanými metodami v expertních laboratořích**

AV Assigned Value

- **Jako průměr výsledků měření všech účastníků po vyloučení odlehlých hodnot**

ALTM All Laboratory Trimmed Mean

- **Průměr výsledků měření stejnorodých skupin účastníků po vyloučení odlehlých hodnot**

ConV Consensus Value

AST: výpočet teoretické TMU

(CV _w) Intraindividuální biologická variabilita*	11,9%	(CV _a) Přesnost odvozená z biologických variabilit	6,0%
(CV _g) Interindividuální biologická variabilita*	17,9%	(b) Systematická chyba (bias) odvozená z biologických variabilit	5,4%
(CV _b) Celková biologická variabilita	21,5%	Celková chyba (TE) odvozená z biologických variabilit Teoretická TMU (cílová nejistota měření)	15,2%

www.westgard.com

Variabilita (proměnlivost)

$$TE = |b| + 1,65.CV_a = 0,25.CV_b + 1,65.0,5.CV_w \quad (\%)$$

$$CV_b = \sqrt{CV_w^2 + CV_g^2} \quad [\%]$$

$$CV_a = 0,5.CV_w \quad [\%]$$

$$b = 0,25.CV_b = 0,25.\sqrt{CV_w^2 + CV_g^2} \quad [\%]$$

Jaké jsou doporučené metody?

Enzym	Referenční metoda	Certifikovaný referenční materiál
ALP	IFCC metoda	JC ERM 20327
AMS	IFCC metoda	ERM-AD456 (IRMM Geel); JC-ERM 20327
AST	IFCC/IRMM metoda	JC-ERM 20327
ALT	IFCC/IRMM metoda	ERM-AD454 (IRMM Geel); JC-ERM 20327
CK	IFCC/IRMM metoda	ERM-AD455 (IRMM Geel); JC-ERM 20327
GGT	IFCC/IRMM metoda	ERM-AD452 (IRMM Geel); JC-ERM 20327
LD	IFCC metoda	ERM-AD453 (IRMM Geel); JC-ERM 20327
LPS		
CHS		
PAMS	IFCC metoda	ERM-AD456 (IRMM Geel); JC-ERM 20327
ACPP		
CKMB mass		

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“
ALP	

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

Kalibrace

- Primární CRM
- Sekundární CRM
- Pracovní kalibrátory výrobců
- Pracovní kalibrátory uživatelů
- Kalibrační faktor vypočítaný z teoretického molárního absorpčního koeficientu nebo stanoveného experimentálně

Aspartátaminotransferáza (AST)



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

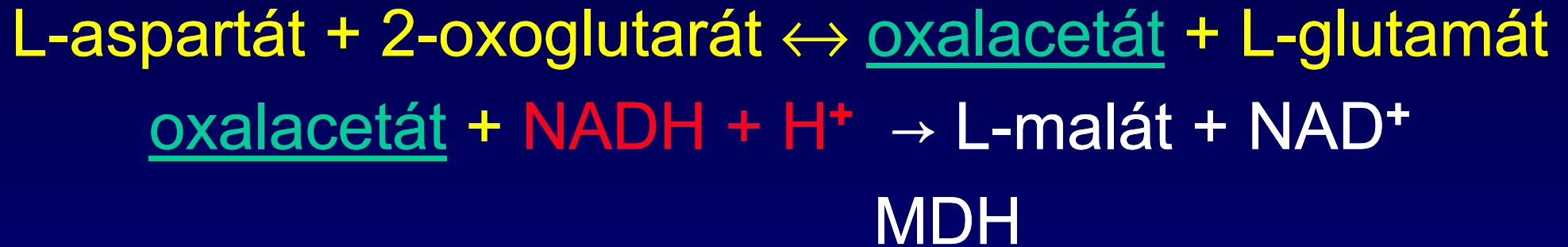
AST

EC 2.6.1.1 L-aspartát: 2-oxoglutarát aminotransferáza

Klinický význam

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

AST



SPEKTROFOTOMETRICKY - pokles absorbance NADH při 340 nm

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

Alaninaminotransferáza (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⁺

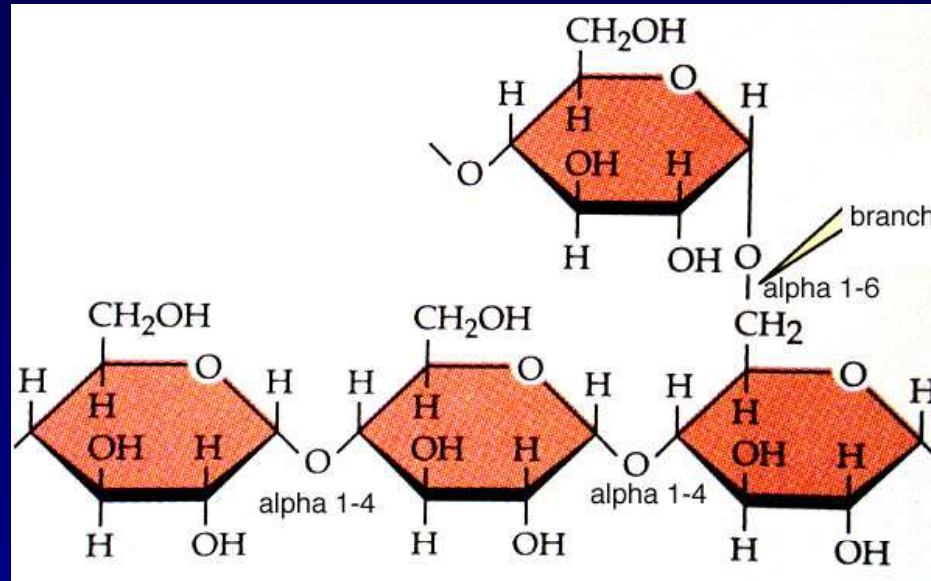
LD

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)

Alfa-amyláza (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, plících)

Sérum obsahuje přibližně stejnou katalytickou koncentraci pankreatického a slinného izoenzymu₄₈

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

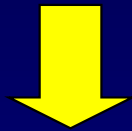


▶ na opačném konci molekuly substrátu navázána např. ethylidenová skupina \Rightarrow „blokováný“ substrát



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

- ▶ druhý doporučený substrát:
(CNP-G3 také Cl-G3-PNP)

2-chloro-4-nitrofenyl- α -D-maltotriosid

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 a kostní izoenzymy (přibližně 1:1)

u dětí je zvýšena aktivita kostního izoenzymu,

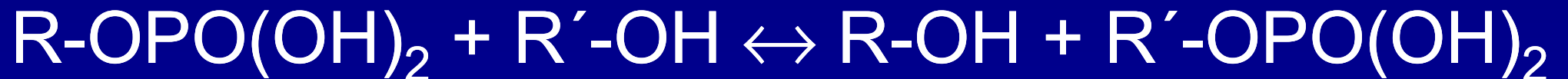
u těhotných žen je detekovatelný placentární izoenzym a

u osob s krevní skupinou 0 a B jsou přítomny stopy střevního izoenzymu.

Hydrolýza



Transfosforylace (přenos fosfátové skupiny na jiný alkohol za vzniku esteru)



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 izoALP)
2. ELEKTROFORÉZA
3. INAKTIVAČNĚ - INHIBIČNÍ metody
4. srážení LEKTINEM (kostní izoenzym)

Kreatinkináza (CK)

EC 2.7.3.2 AT:kreatin-N-fosfotransferáza



V cytoplazmě a mitochondriích buněk kosterního svalstva, srdce, mozku a hladké svalovině (Poznámka: erytrocyty neobsahují CK)

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)



Hexokináza



G6PD

SPEKTROFOTOMETRICKY -nárůst absorbance NADPH při 340 nm

Reaktivace: N-ACETYL CYSTEIN (NAC)

Izoenzymy CK

CK se skládá ze 2 podjednotek (dimer; $M_r=40\ 000$):

M (muscle) a **B** (brain)

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

je možné detekovat i **makroenzym**: CK- makro

Izoformy izoenzymů: vznikají odštěpením koncových lysinových molekul

CK-MB1 (žádný lysin) a CK-MB2 (1 lysin)

CK-MM1 (žádný lysin), CK-MM2 (1 lysin) a

CK- MM3 (2 lysiny)

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)

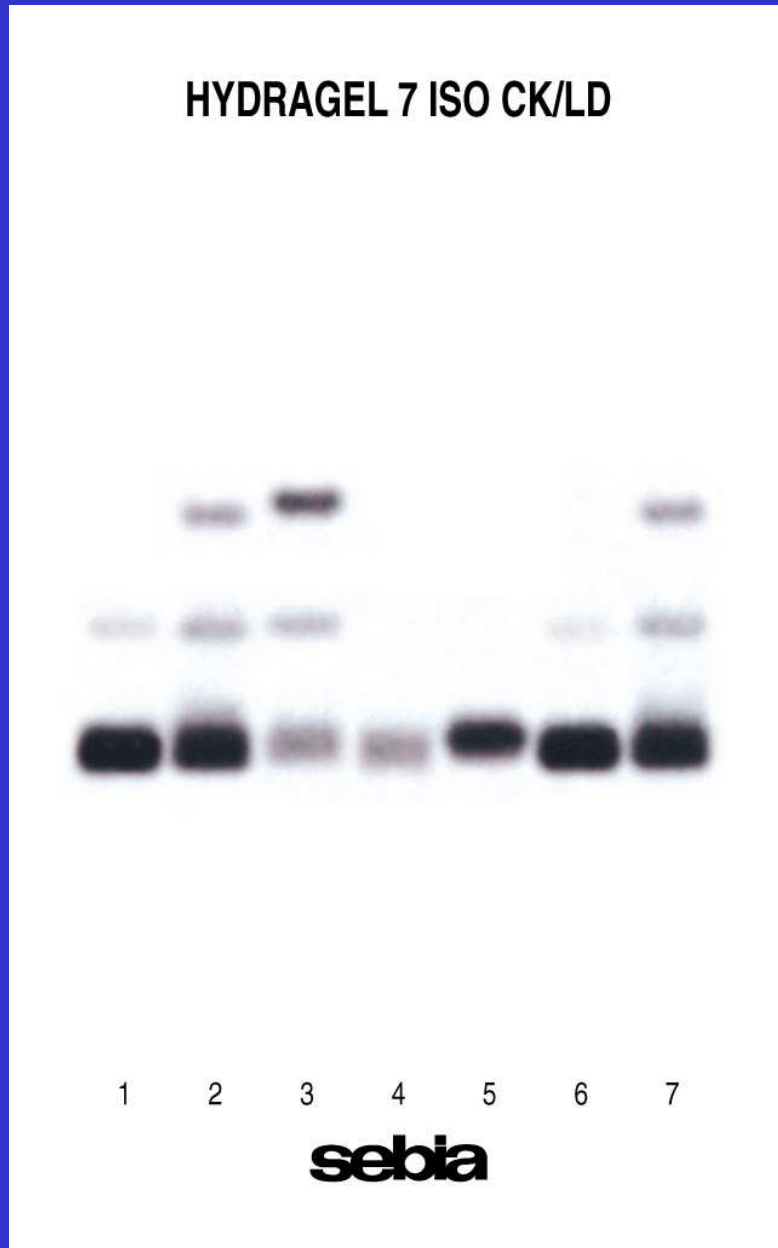
potom: pokud CK-BB = 0 (nepřítomen)

a CK-MM = 0 (inhibice)

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

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

Izoenzymy CK

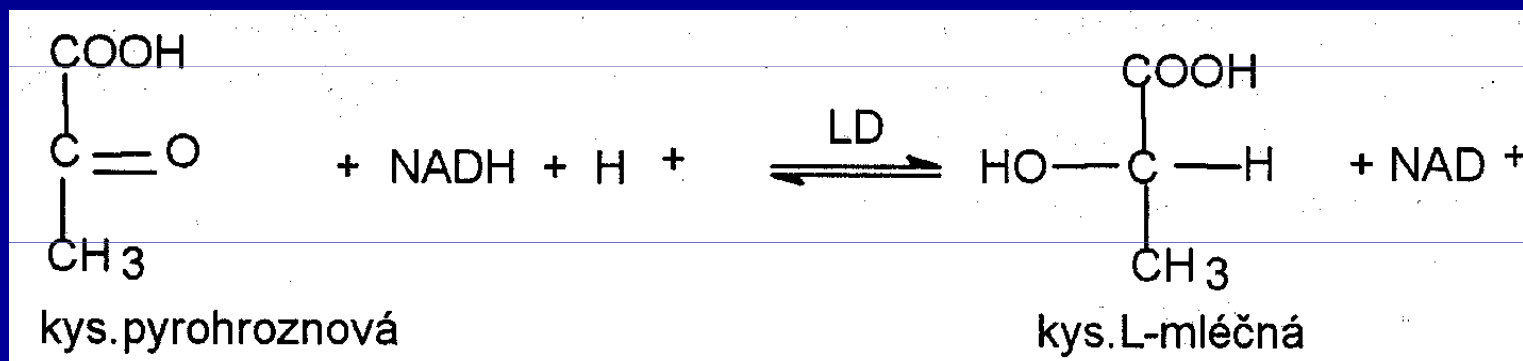


Laktátdehydrogenáza (LD)

- 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:

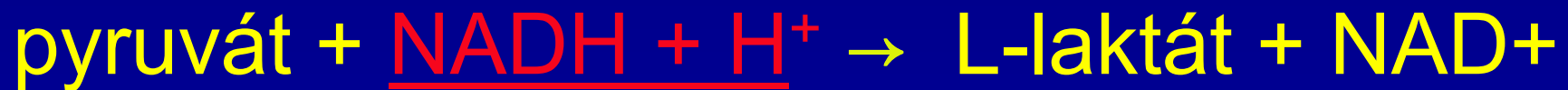
1. IFCC (37°C)

Substrát: L-laktát



SPEKTROFOTOMETRICKY -nárůst absorbance NADH při 340 nm

2. Substrát: pyruvát



SPEKTROFOTOMETRICKY -pokles absorbance NADH při 340 nm

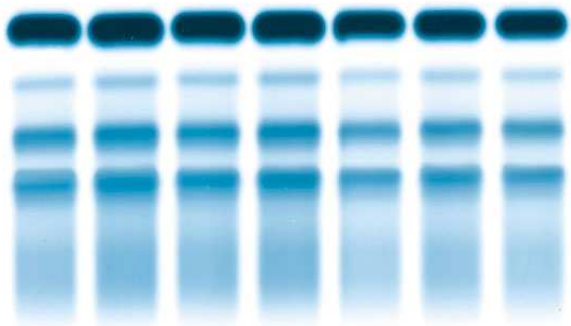
Izoenzymy LD

- 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

HYDRAGEL 7 PROTEIN(E)



1 2 3 4 5 6 7

sebia

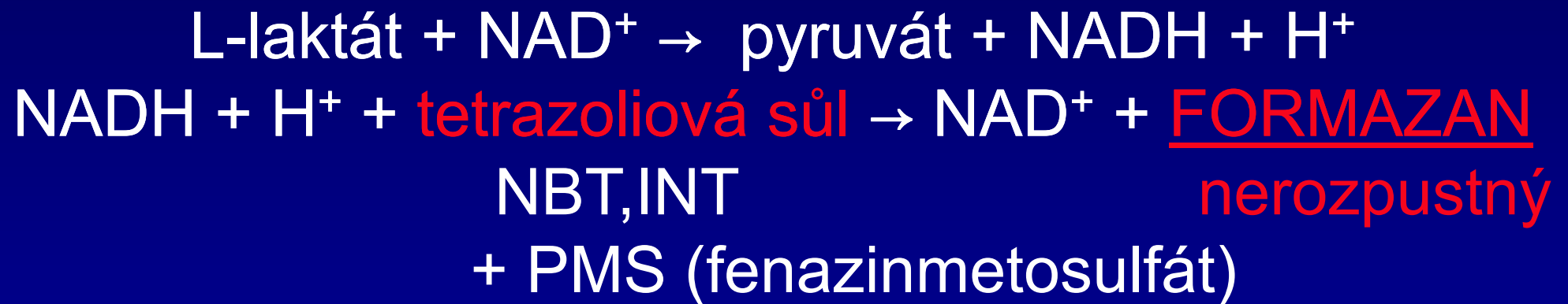
HYDRAGEL 7 ISO CK/LD



1 2 3 4 5 6 7

sebia

Detekce izo LD na 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

Cholinesterázy (CHE)

hydrolýza

estery CHOLINU + H₂O → CHOLIN + příslušná kyselina

- **Acetylcholinesterázy**



jsou obsaženy v erytrocytech, mozku, plicích,
štěpí přednostně acetylcholin (nervová zakončení)

- **Pseudocholinesterázy** (butyrylcholinesterázy)

pocházejí z ribosomů jaterních buněk → krev
→ sérum a plazma

Klinický význam:

Patologické je především snížení aktivity.

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

Metody stanovení:

butyrylthiocholin + H₂O → thiocholin + butyrát

thiocholin + DTNB ⇒ 5-merkapt-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

ACP

monoestery kyseliny o-fosforečné + H₂O



alkohol / fenol + fosforečnan

ACP katalyzuje stejnou chemickou reakci jako ALP

optimální pH je < 7,0

V séru lze dokázat prostatický a kostní izoenzym, dále malé množství jaterního, erytrocytárního a trombocytárního izoenzymu.

ACP není v séru/plazmě stabilní !

Klinický význam:

- onemocnění prostaty (karcinom)
- některá kostní onemocnění (tumory a metastázy)
- chronická ledvinná nedostatečnost

ACPP je pro dg.ca prostaty nahrazeno imunochemickým stanovením PSA

ACP

Metody stanovení:

1. Substrát: **4-NITROFENYLFOSFÁT**

4-NITROFENOL v kyselém prostředí není barevný, pro stanovení používalo manuální provedení (end-point) po zastavení enzymové reakce např. roztokem NaOH

2. Substrát: **1-NAFTYLFOSFÁT**

$1\text{-NAFTYLFOSFÁT} + \text{H}_2\text{O} \Rightarrow 1\text{-NAFTOL} + \text{fosforečnan}$

$1\text{-NAFTOL} + \text{diazoniová sůl} \Rightarrow \underline{\text{azobarvivo}}$

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