

# 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:

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

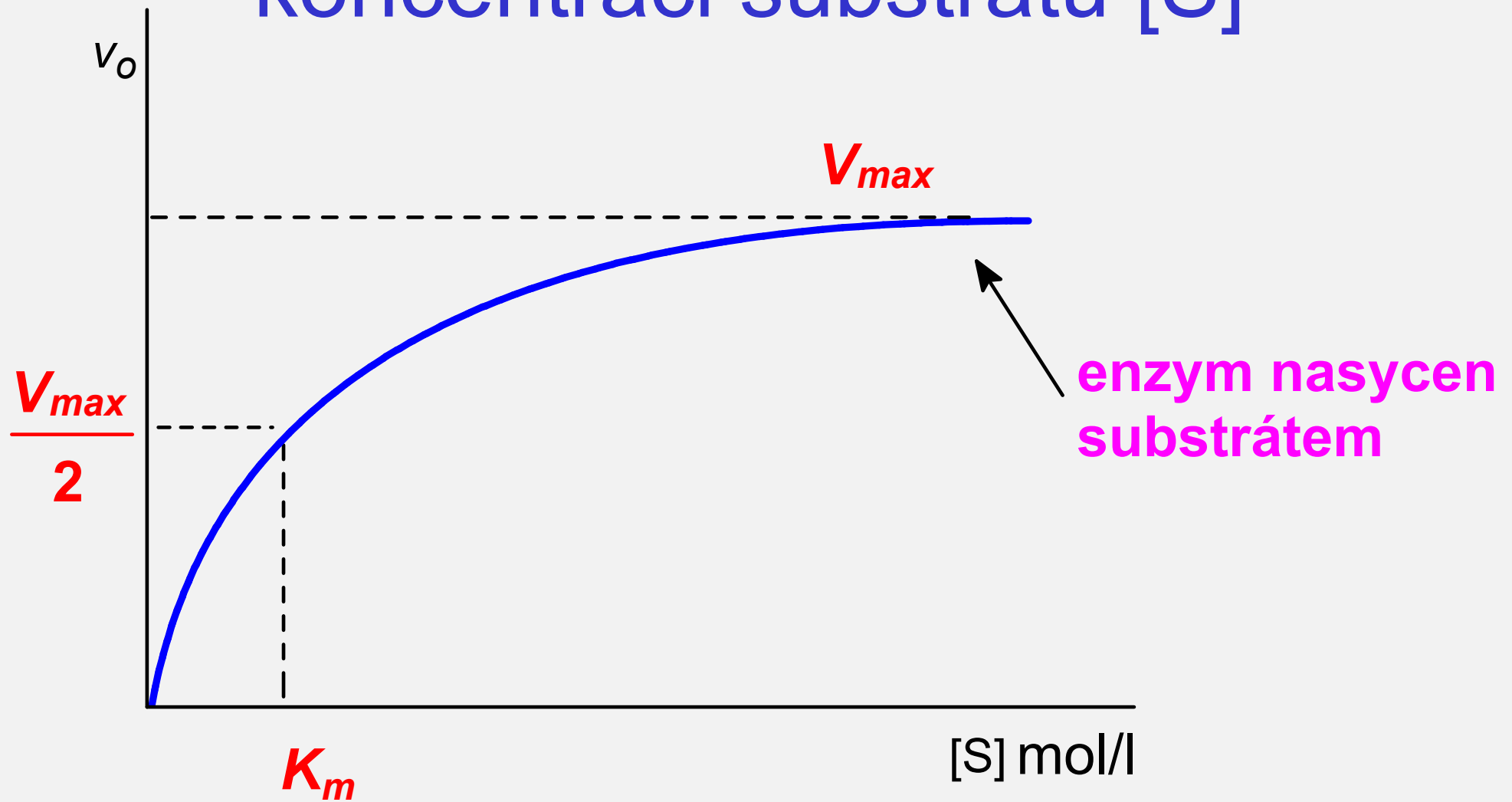
# Faktory ovlivňující enzymovou reakci

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,  $\text{Ca}^{2+}$  (koagulační faktory),  $\text{Mg}^{2+}$  (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 <sup>+</sup>       | akceptor 2H                             |
| Nikotinamid | NADPH + H <sup>+</sup> | donor 2H                                |
| Riboflavin  | FAD                    | akceptor 2H                             |
| -----       | tetrahydrobiopterin    | donor 2H                                |
| -----       | molybdopterin          | přenos elektronů                        |
| -----       | lipoát                 | akceptor 2H                             |
| -----       | ubichinon              | přenos 2 elektronů (a 2H <sup>+</sup> ) |
| -----       | 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      | $\text{H}_4$ -folát | $\text{C}_1$ skupiny |
| Biotin                | karboxybiotin       | $\text{CO}_2$        |
| 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**

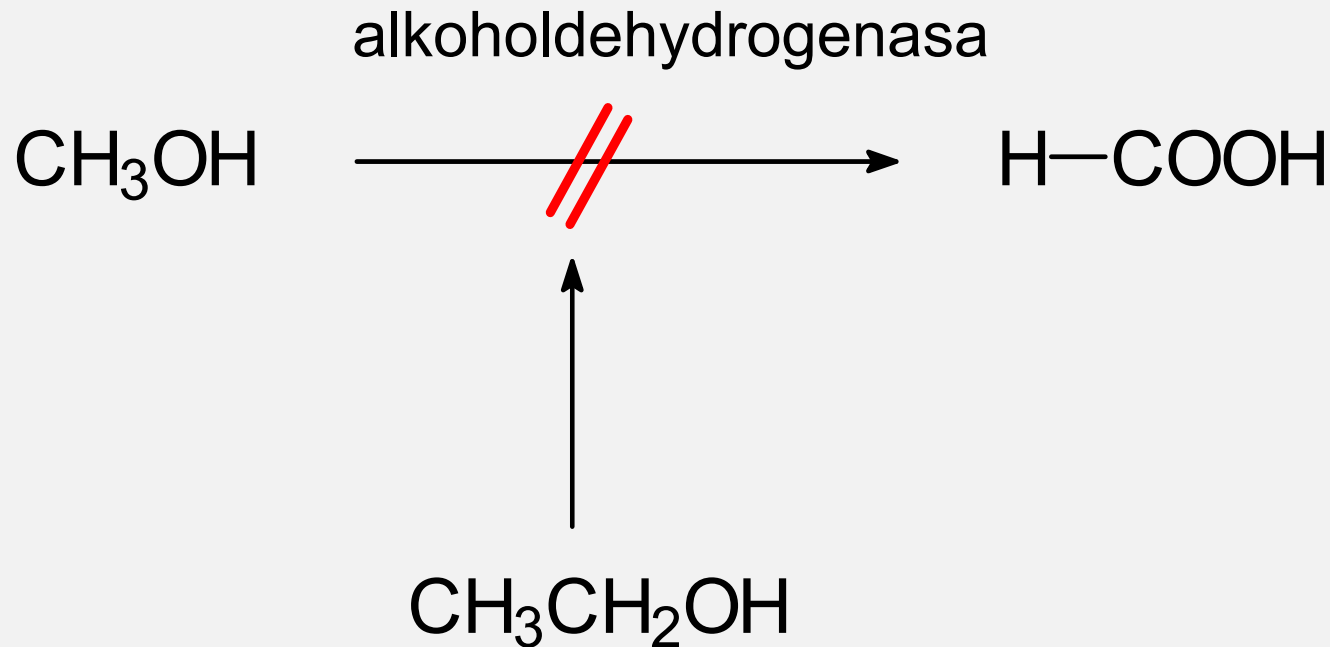
**nekompetitivní**

# 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  $\alpha$ -Amyláza ( AMS)
- ▶ Systémové (vědecké)  
1,4- $\alpha$ -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
- **$\mu\text{g/l}$ ,  $\text{ng/l}$**
- 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

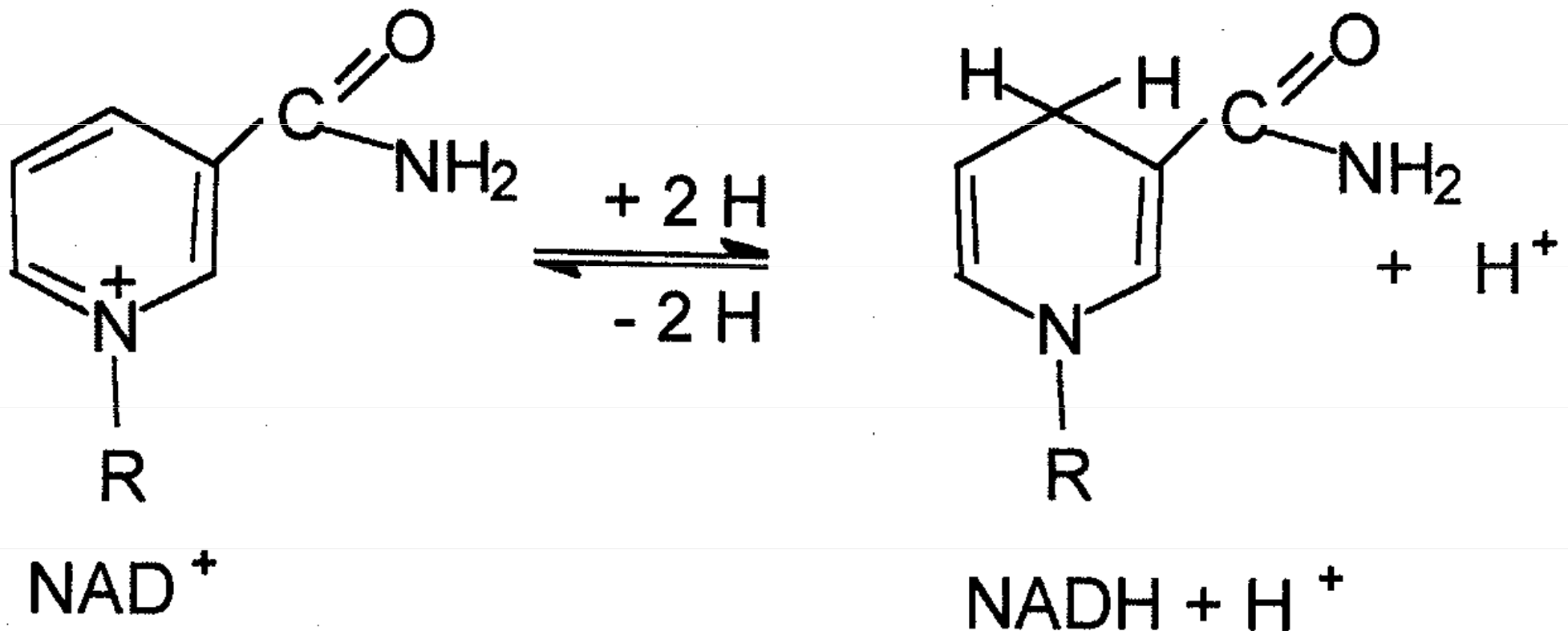
$$\Delta A / \Delta t = \frac{A_2 - A_1}{t_2 - t_1}$$

- „end-point“

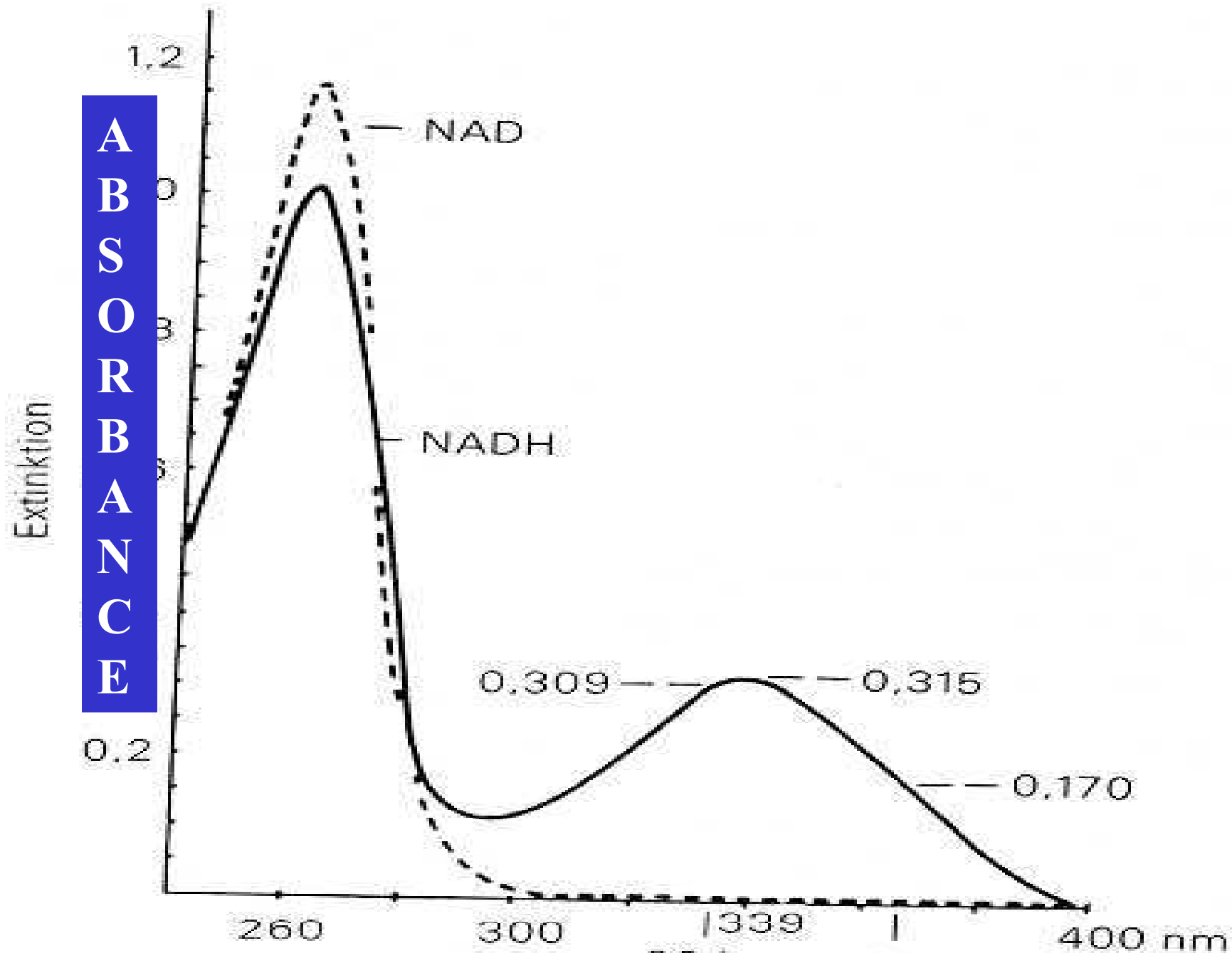
- Měří se [P] po proběhnutí reakce
- Jedno měření
- **nedoporučovány**

# 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**

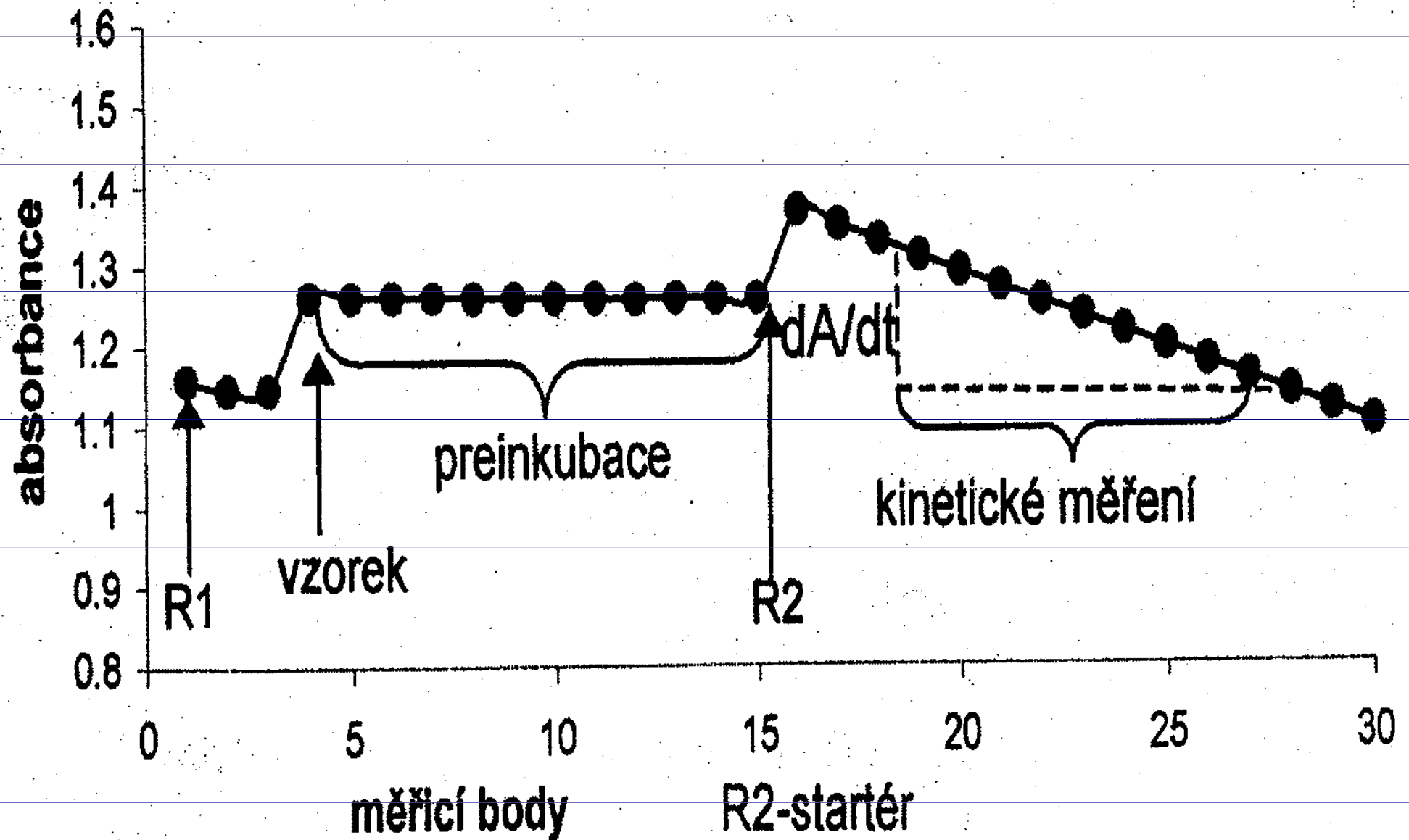


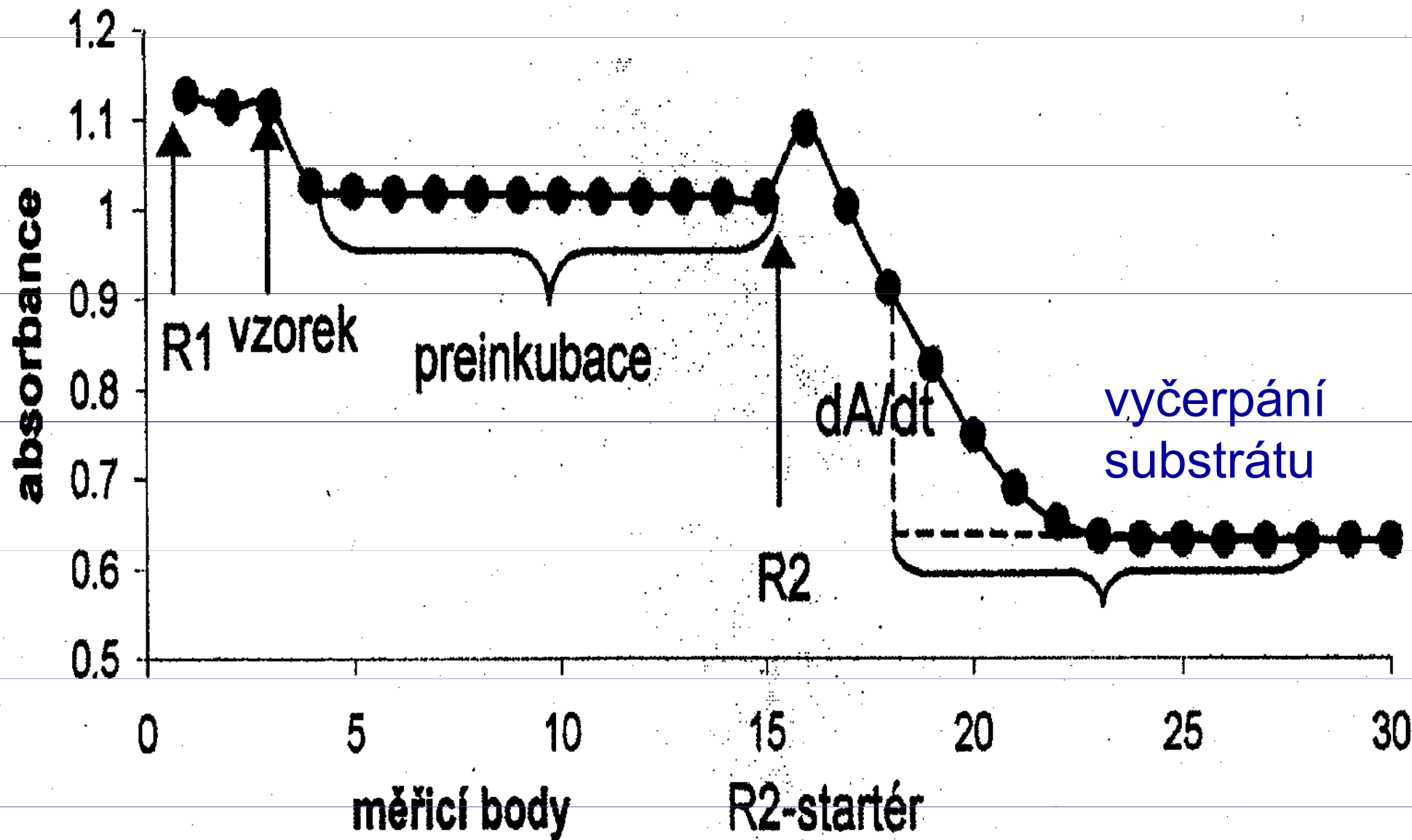
**VLNOVÁ DÉLKA**

# 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  $V_{max}$

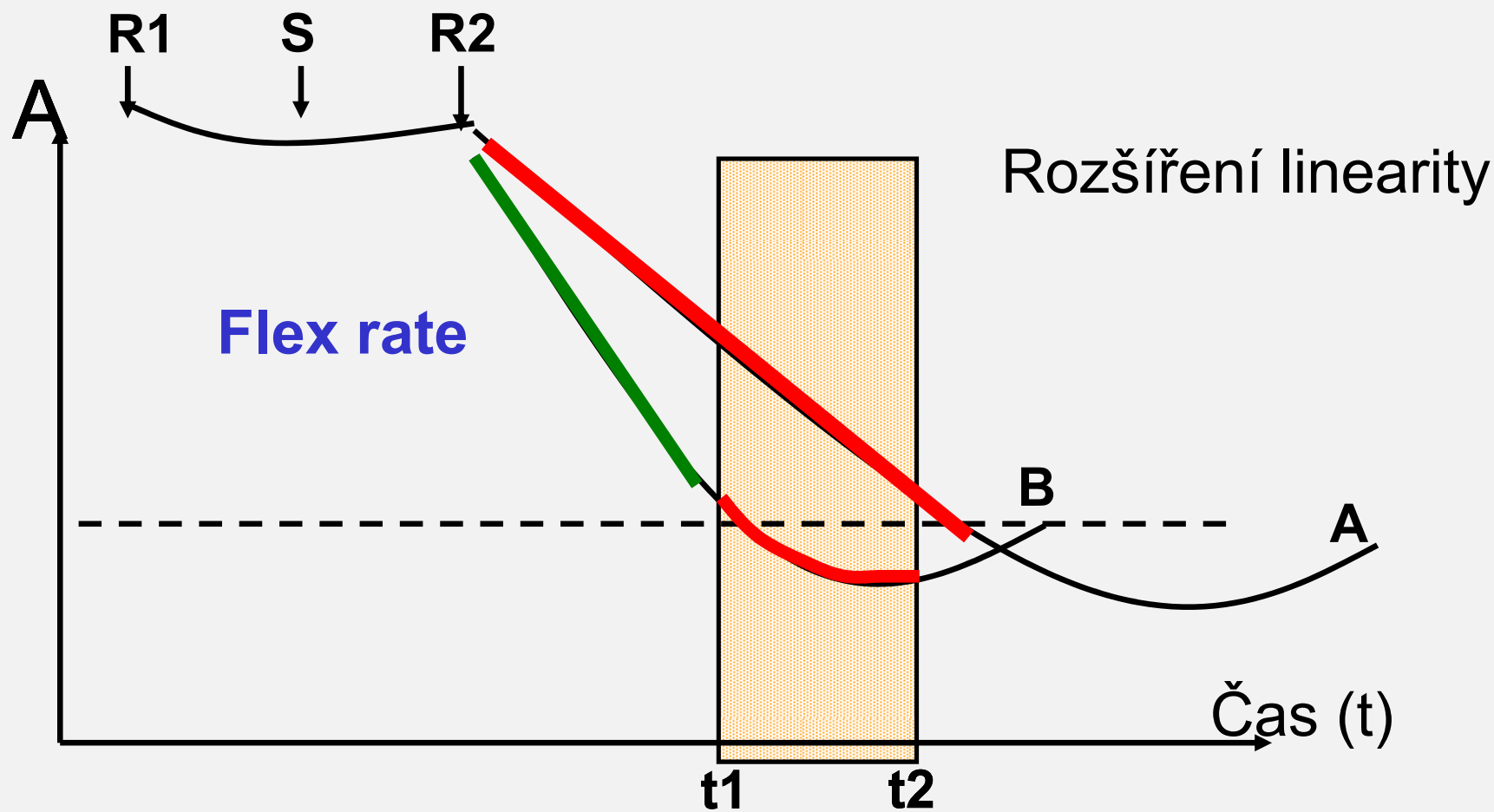
# Vliv časového intervalu, ve kterém měříme







# 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  $\text{nkat/l}$

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 <sub>w</sub> ) Intraindividuální biologická variabilita* | <b>11,9%</b> | (CV <sub>a</sub> ) Přesnost odvozená z biologických variabilit                                    | <b>6,0%</b>  |
| (CV <sub>g</sub> ) Interindividuální biologická variabilita* | <b>17,9%</b> | (b) Systematická chyba (bias) odvozená z biologických variabilit                                  | <b>5,4%</b>  |
| (CV <sub>b</sub> ) Celková biologická variabilita            | <b>21,5%</b> | Celková chyba (TE) odvozená z biologických variabilit<br>Teoretická TMU (cílová nejistota měření) | <b>15,2%</b> |

[www.westgard.com](http://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

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

# 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)

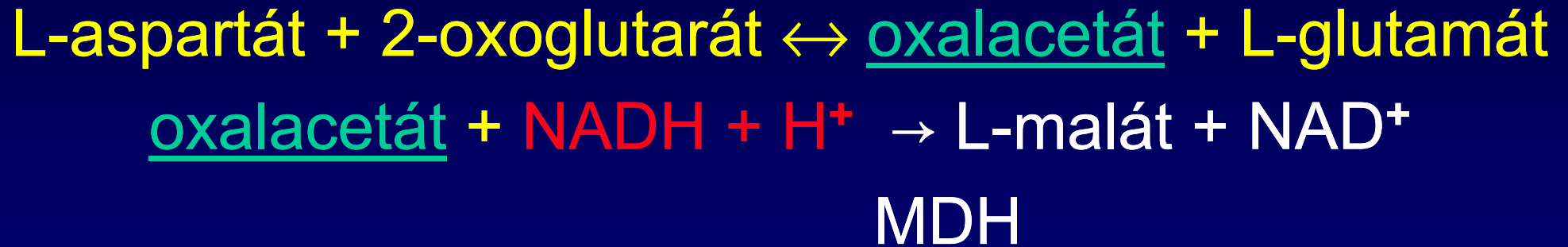
# AST

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<sup>+</sup>  $\Rightarrow$  L-laktát + NAD<sup>+</sup>
- **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<sup>+</sup>  $\Rightarrow$  L-laktát + NAD<sup>+</sup>

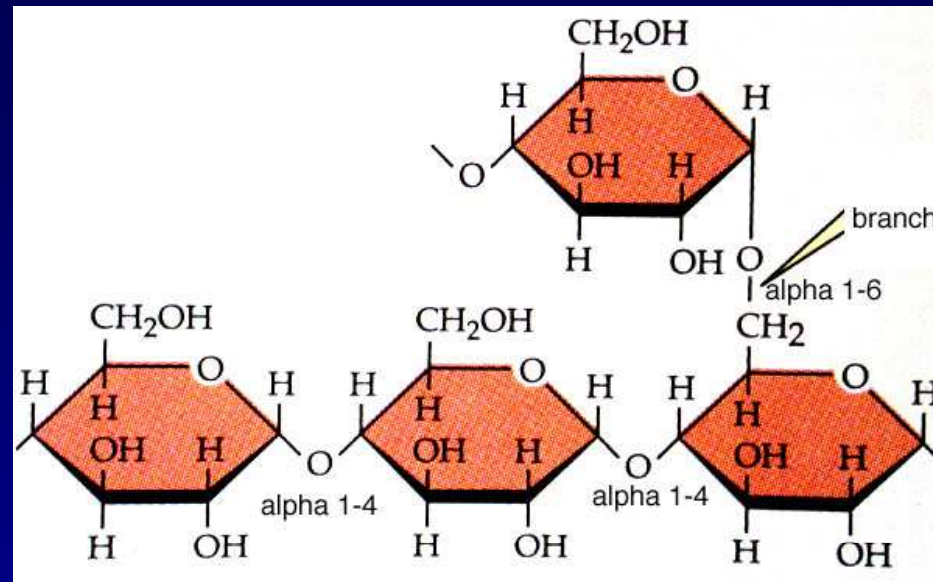
LD

SPEKTROFOTOMETRICKY - pokles absorbance NADH při 340 nm

- pyruvát + NADH + H<sup>+</sup>  $\Rightarrow$  L-laktát + NAD<sup>+</sup>
- **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  $\alpha$ -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 izoenzymu<sub>48</sub>



# 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)- $\alpha$ -(1,4)-D-maltoheptaosid

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

▶ +  $\alpha$ -Glukosidáza

▶ substráty značené 4-nitrofenolem na konci molekuly

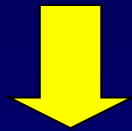


▶ na opačném konci molekuly substrátu navázána např. ethylidenová skupina  $\Rightarrow$  „blokováný“ substrát



1 molekula EPS

4,6-ethyliden(G7)-4-nitrofenyl(G1)- $\alpha$ -(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- $\alpha$ -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 + 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 a kostní izoenzymy (přibližně 1:1)

u dětí je zvýšena aktivita kostního izoenzymu,

u těhotných žen je detekovatelný placentární izoenzym a

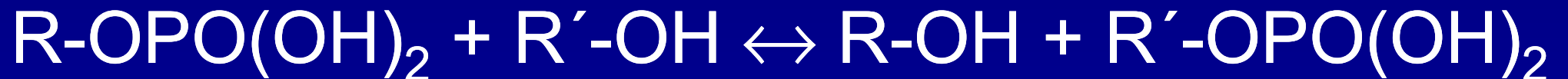
u osob s krevní skupinou 0 a B jsou přítomny stopy střevního izoenzymu.



## 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 + 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 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



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)

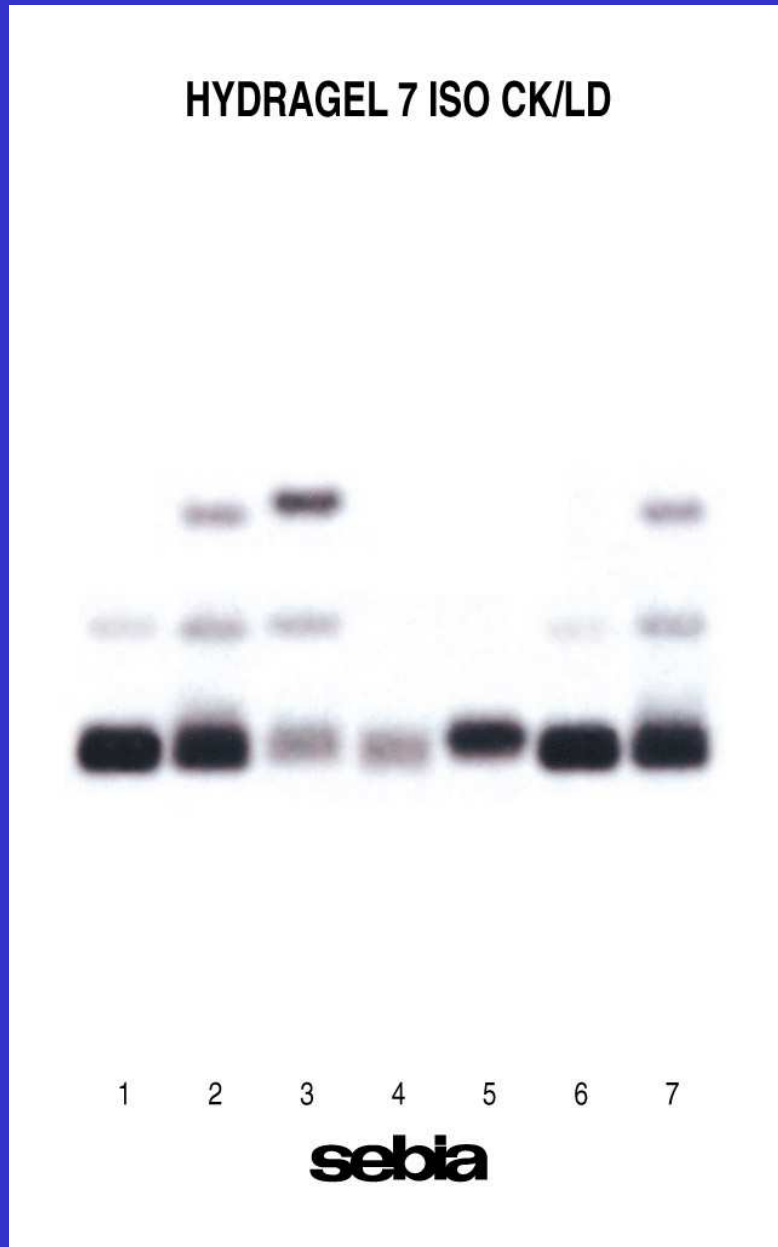
*potom:* pokud CK-BB = 0 (nepřítomen)

a CK-MM = 0 (inhibice)

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

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

# Izoenzymy CK

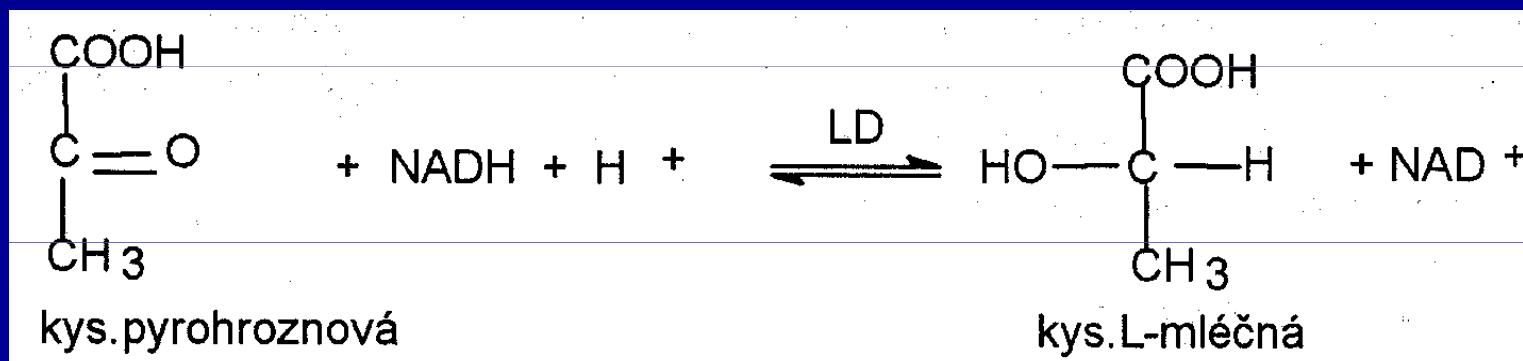


# Laktátdehydrogenáza (LD)

- 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:

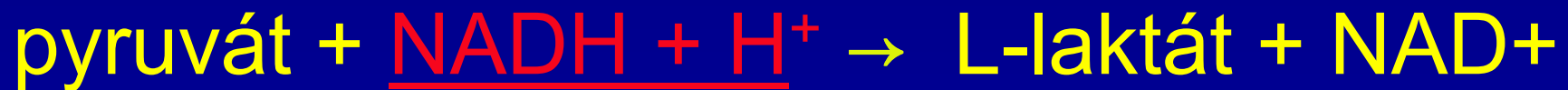
### 1. IFCC (37°C)

Substrát: L-laktát



SPEKTROFOTOMETRICKY -nárůst absorbance NADH při 340 nm

### 2. Substrát: pyruvát



SPEKTROFOTOMETRICKY -pokles absorbance NADH při 340 nm

# Izoenzymy LD

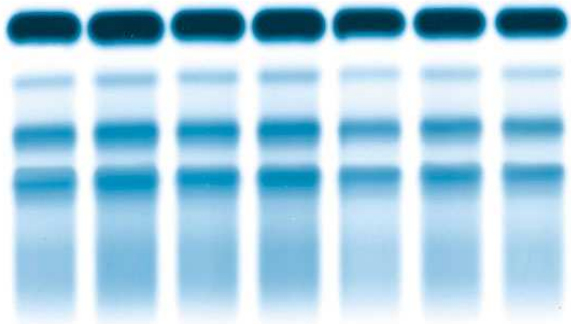
- Aktivní enzym je tetramér - skládá se ze 4 podjednotek
- Existují 2 druhy podjednotek: M( muscle/sval) a H (heart/srdce)
- Kombinací vzniká 5 izoenzymů :

|     |      |
|-----|------|
| LD1 | H4   |
| LD2 | H3M  |
| LD3 | H2M2 |
| LD4 | HM3  |
| LD5 | M4   |



# Izoenzymy LD

HYDRAGEL 7 PROTEIN(E)



1 2 3 4 5 6 7

**sebia**

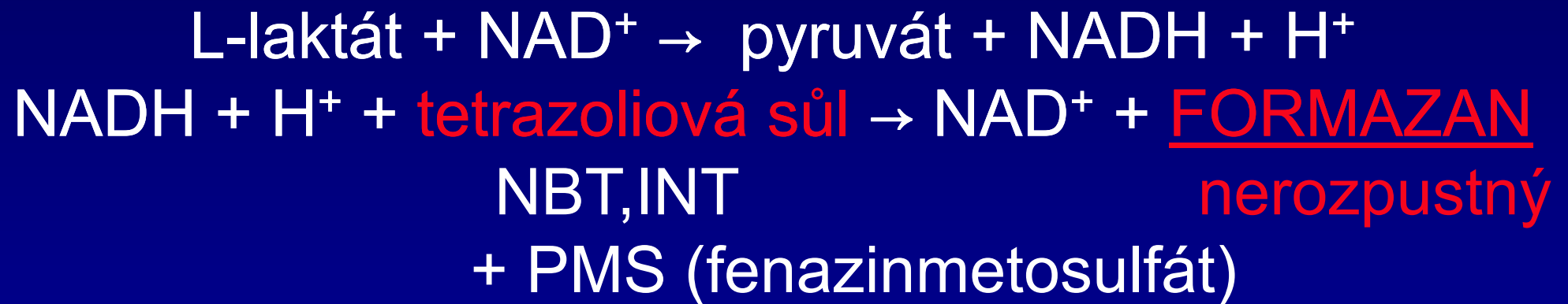
HYDRAGEL 7 ISO CK/LD



1 2 3 4 5 6 7

**sebia**

# Detekce izo LD na elektroforeogramu



# GGT

Katalyzuje přenos  $\gamma$ -glutamylového zbytku z  $\gamma$ -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.

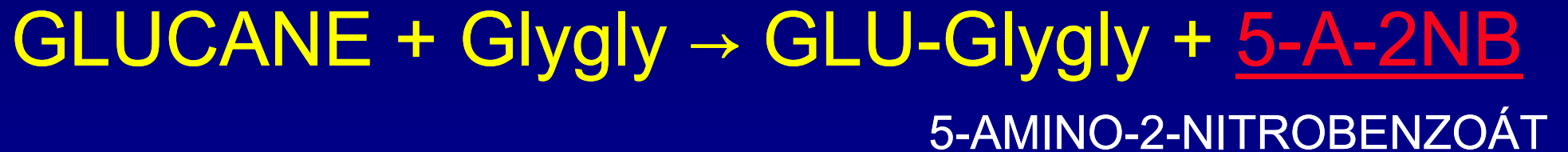
## Klinický význam:

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

# 1. IFCC (37°C)

Substrát:

$\gamma$ -L-glutamyl-3-karboxy-4-nitranilid (GLUCANE)



Glygly = GLYCYLGLYCIN

# LPS

TRI- a DIACYLGLYCEROLY + H<sub>2</sub>O → 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 + 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

# Cholinesterázy (CHE)

hydrolýza

estery CHOLINU + H<sub>2</sub>O → 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 chybění, 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-merkapt-2-nitrobenzoová  
kyselina

# ACP

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



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