

# **Analytické stanovení enzymů**

*M. Beňovská*

# Množství enzymu v biologickém materiálu lze vyjádřit dvojím způsobem

## Nepřímé stanovení

- katalytická koncentrace aktivity
- $\mu\text{kat/l}$
- stanoví se reakční rychlost (odpovídá koncentraci produktu enzymové reakce – stanovujeme koncentraci produktu či substrátu)
- při 37 °C
- většina klinicky významných enzymů

## Přímé stanovení

- hmotnostní koncentrace
- $\mu\text{g/l}$ ,  $\text{ng/l}$
- stanoví se molekula enzymu jako antigen (imunochemicky – existuje-li specifická protilátka proti stanovovanému enzymu)
- např. tumorové markery - NSE, CKMB, ALP kostní

# Metody stanovení katalytické koncentrace aktivity enzymu

## Kinetické

- Spektrofotometrické stanovení **rychlosti enzymové reakce kontinuálním měřením absorbance v závislosti na čase (změna absorbance za časovou jednotku)**
- Průběžně se měří [S] nebo [P]
- Řada měření

## Konstantního času

- „end-point“

- Měří se [P] po proběhnutí reakce – reakci necháme doběhnout do konce
- Jedno měření - zjistí se průměrná rychlost – méně přesné
- **nedoporučené, v klinických laboratořích se neprovádí**

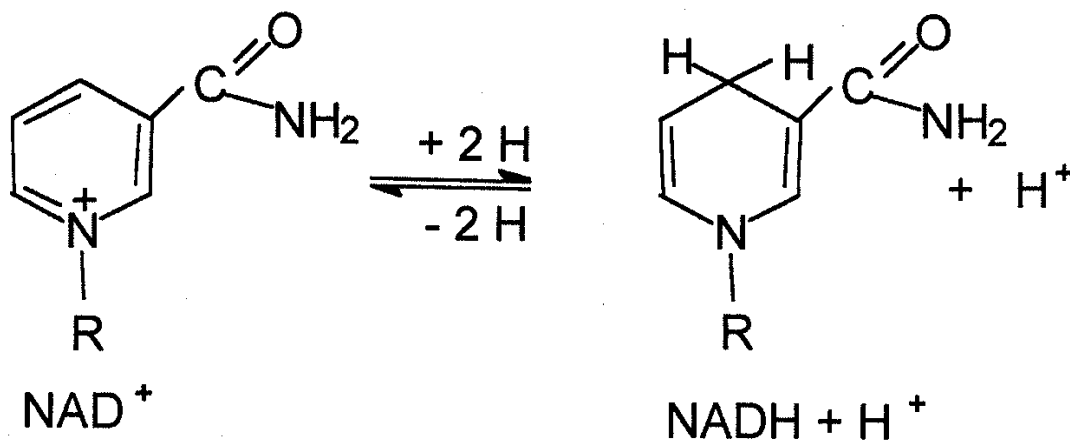
# Doporučené metody

<b>Enzym</b>	<b>Referenční metoda</b>	<b>Certifikovaný referenční materiál</b>
<b>ALP</b>	IFCC metoda	JC ERM 20327
<b>AMS</b>	IFCC metoda	ERM-AD456 (IRMM Geel); JC-ERM 2032
<b>AST</b>	IFCC/IRMM metoda	JC-ERM 20327
<b>ALT</b>	IFCC/IRMM metoda	ERM-AD454 (IRMM Geel); JC-ERM 20327
<b>CK</b>	IFCC/IRMM metoda	ERM-AD455 (IRMM Geel); JC-ERM 20327
<b>GGT</b>	IFCC/IRMM metoda	ERM-AD452 (IRMM Geel); JC-ERM 20327
<b>LD</b>	IFCC metoda	ERM-AD453 (IRMM Geel); JC-ERM 20327
<b>LPS</b>		
<b>CHS</b>		
<b>PAMS</b>	IFCC metoda	ERM-AD456 (IRMM Geel); JC-ERM 20327

*IFCC - International Federation of Clinical Chemistry*

# Optický test

- Měříme změny absorbance v UV-oblasti (při 340 nm) způsobené změnami koncentrace redukovaných forem koenzymů  $\text{NADH} + \text{H}^+$  nebo  $\text{NADPH} + \text{H}^+$
- **Využívá se například při stanovení ALT a AST**



# Alaninaminotransferáza (ALT)

*L-alanin:2-oxoglutarátaminotransferáza, EC 2.6.1.2.*

V metabolismu **katalyzuje** transaminační reakci:

**L-alanin + 2-oxoglutarát --> pyruvát + L-glutamát**

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

Klinický význam

- onemocnění jater (infekční virová hepatitida, mononukleóza, chronické jaterní choroby,...)
- onemocnění žlučových cest
- dekompenzované srdeční vady

# ALT

## Referenční rozmezí:

**M 0,20 - 0,80  $\mu$ kat/l**

**Ž 0,20 - 0,60  $\mu$ kat/l**

## Interference:

Výsledky ovlivňuje silná hemolýza - ALT 7x více v erytrocytech než v plasmě

# Stanovení ALT – doporučená metoda

Materiál : sérum, plasma

Do reakční směsi se přidává **pyridoxal-5-fosfát (PDP)** jako koenzym (aktivuje Apo-ALT --> ALT\*)

PDP obsažen v séru, ale patologicky ho může být nedostatek

**L-alanin + 2-oxoglutarát <--> pyruvát + L-glutamát (ALT)**

**pyruvát + NADH + H<sup>+</sup> <--> L-laktát + NAD<sup>+</sup> (LD)**

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

- předinkubace při +37°C - při ní dojde k odstranění pyruvátu ze vzorku
- start : 2-oxoglutarát ( 2 činidlová metoda)



# Aspartátaminotransferáza (AST)

*L-aspartát:2-oxoglutarátaminotransferáza, EC 2.6.1.1*

V metabolismu **katalyzuje** transaminační reakci:

L-aspartát + 2-oxoglutarát <--> oxalacetát + L-glutamát

AST obsažena v cytoplasmě a v mitochondriích všech buněk - zvláště hepatocytů, buněk srdečního svalu, ledvin a kosterních svalů

Klinický význam

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

# AST

## Referenční rozmezí:

**M 0,17 - 0,85  $\mu$ kat/l**

**Ž 0,17 - 0,60  $\mu$ kat/l**

## Interference:

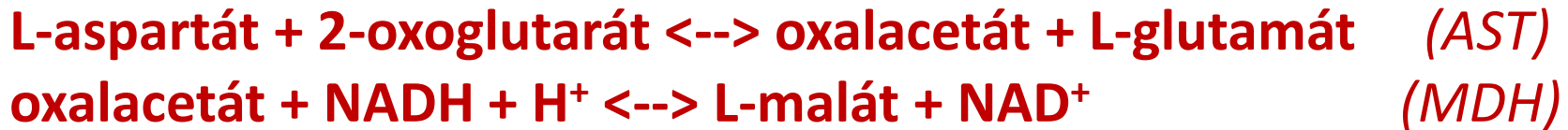
Výsledky ovlivňuje hemolýza - aktivita AST 40x vyšší v erytrocytech než v séru

# Stanovení AST – doporučená metoda

Materiál : sérum, plasma

Do reakční směsi se přidává **pyridoxal-5-fosfát (PDP)** jako koenzym (aktivuje Apo-AST --> AST\*)

PDP obsažen v séru, ale patologicky ho může být nedostatek



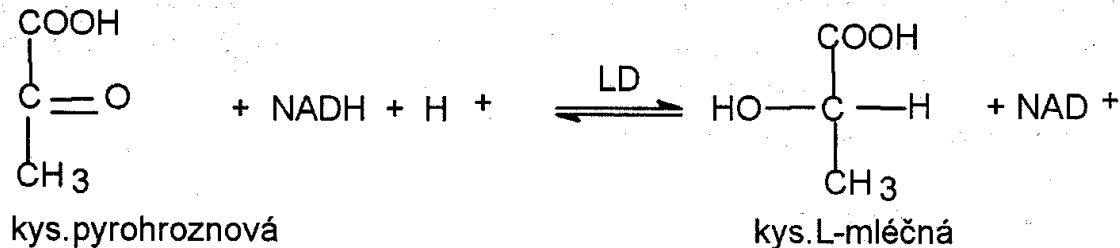
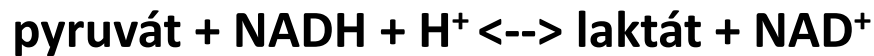
FOTOMETRICKY - **pokles absorbance NADH při 340 nm**

- předinkubace při +37°C - při ní dojde k odstranění pyruvátu ze vzorku (Ve vzorku enzym laktátdehydrogenáza - dochází k reakci, při které je pyruvát odstraňován, ale současně dochází k úbytku NADH - falešně vyšší rychlost úbytku NADH)
- start : 2-oxoglutarát ( 2 činidlová metoda)

# Laktátdehydrogenáza (LD)

*L-laktát: NAD<sup>+</sup>oxidoreduktasa, EC 1.1.1.27.*

- **Cytoplasmatický enzym - katalyzuje reakci anaerobní glykolýzy, je přítomen ve všech tkáních**



- **Zvýšení jeho aktivity v krvi není orgánově specifické - slouží spíše k vyloučení onemocnění**

# LD

**Referenční rozmezí:** < 4,2  $\mu$ kat/l

S-LD1	30,3 - 37,3 %
S-LD2	37,7 - 43,9 %
S-LD3	16,0 - 23,6 %
S-LD4	0,9 - 3,1 %
S-LD5	2,2 - 4,6 %

## **Interference:**

Výsledky značně ovlivňuje hemolýza - LD až 160x více v erytrocytech než v séru

## **Klinický význam:**

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

# Stanovení LD – doporučená metoda

**Materiál : sérum, plasma, (punktát)**

**Substrát: L-laktát**



**FOTOMETRICKY - nárůst absorbance NADH při 340 nm**

**Stanovení izoenzymů:**

- **Elektroforetické metody – vyjimečně**

# Alkalická fosfatáza (ALP)

*orthofosfát: monoesterfosfohydroláza, alkalické optimum, EC 3.1.3.1.*

ALP katalyzuje reakci:

monoester kyseliny o-fosforečné + H<sub>2</sub>O ↔ alkohol/fenol + fosforečnan (hydrolýza)

R-OPO(OH)<sub>2</sub> + R'-OH ↔ R-OH + R'-OPO(OH)<sub>2</sub> (přenos fosfátové skupiny na jiný alkohol  
-transfosforylace)

U dospělých zdravých osob převažují **játerní** izoenzymy, u zdravých dětí **kostní** izoenzym, u těhotných žen placentární (až 50%), u osob s krevní skupinou 0 a B je dokazatelný i střevní izoenzym

# ALP

## Referenční rozmezí:

**M (18-120r) 0,67 - 2,17  $\mu$ kat/l**  
**(1-18r) 1,35-7,50  $\mu$ kat/l**

**Ž (18-120r) 0,58 - 1,75  $\mu$ kat/l**

## Klinický význam:

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

## Nespecifický



# Stanovení ALP – doporučená metoda

Materiál : sérum, plasma

ALP hydrolyticky štěpí 4-nitrofenylfosfát (substrát) v přítomnosti pufru AMP (2-amino-2-methyl-1-propanol) na 4-nitrofenol a fosforečnan



FOTOMETRICKY: Zvýšení absorpance 4-NITROFENOLU při **410 nm**

*Pozn.:* V ČR dříve unifikována metoda s pufrům MEG (N-methyl-D-glukamin) – vyvinuta v Lachema Brno

# Stanovení izoenzymů ALP

Provádí se výjimečně

- ***Elektroforetické metody***
- ***Imunoanalytické metody***
  - pro stanovení koncentrace kostního izoenzymu
  - po reakci se specifickou protilátkou proti stanovovanému izoenzymu imunoanalyticky (hmotnostní koncentrace)

# **GAMA GLUTAMYLTRANSFERÁZA (GGT)**

**gama-glutamyl-peptid:aminolyselina gama-glutamyltransferasa, EC 2.3.2.2.**

- **GGT katalyzuje přenos  $\gamma$ -glutamylového zbytku z  $\gamma$  - glutamylpeptidů na jiný akceptor (např. peptid nebo aminokyselinu)**
- **GMT je vázána na cytoplasmatické membrány epitelu žlučových cest, ledvinných tubulů, jater, pankreatu, střeva, erytrocytů,...)**
- **V krvi dokazatelný enzym je převážně jaterního původu**

# GGT

**Referenční rozmezí:** M 0,17 - 1,19  $\mu\text{kat/l}$   
Ž 0,10 - 0,70  $\mu\text{kat/l}$

**Klinický význam:**

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

# Stanovení GGT – doporučená metoda

Materiál : sérum, plasma

Substrát: L-gama-glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilid (Glucane)

GGT přenáší gama-glutamylovou skupinu ze substrátu (Glucane) na glycyglycin (GlyGly), který v metodě funguje i jako pufr

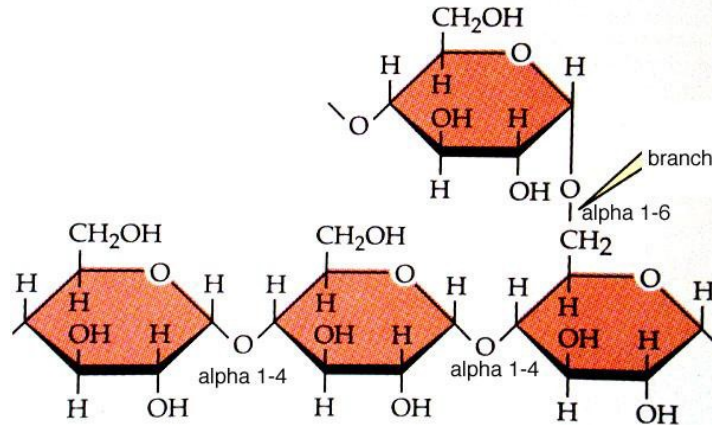
**Glucane + Glygly  $\leftrightarrow$  5-A-2NB + Glu-GlyGly (GGT)**

FOTOMETRICKY: Zvýšení absorbance žlutého 5-amino-2-nitrobenzoátu (5-A-2NB)

# $\alpha$ -amyláza (AMS)

*alfa-1,4-D-glukan-4-glukanohydrolasa, EC 3.2.1.1.*

AMS štěpí  $\alpha$ -1,4 glykozidické vazby



**Polysacharidy + H<sub>2</sub>O → Oligosacharidy → Maltóza**

Štěpí glykozidické vazby uvnitř polysacharidového řetězce (endohydroláza)

AMS je sekreční enzym vytvářený pankreatem a slinnými žlázami, vzniká částečně i v játrech

Fyziologicky sérum obsahuje přibližně stejnou katalytickou koncentraci pankreatického a slinného izoenzymu

# AMS

Referenční rozmezí: **S,P** <1,67  $\mu\text{kat/l}$   
**U** <7,67  $\mu\text{kat/l}$

## Klinický význam

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

# Stanovení AMS – doporučená metoda

Materiál : sérum, plasma, moč (především jednorázová), punktát

substrát : EPS-G7-PNP

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

**EPS-G7-PNP + H<sub>2</sub>O  $\leftrightarrow$  7 glukóza + 4-nitrofenol (AMS)**

**FOTOMETRICKY: Zvýšení absorbance 4-NITROFENOLU při 405 nm**

Ethylidinová koncová skupina je vázána na koncovou molekulu glukózy(G7), která chrání substrát před účinkem jiných enzymů typu glukozidáz, na opačném konci je navázán 4-nitrofenol. AMS v substrátu hydrolyticky štěpí vnitřní vazby, vznikají jednotlivé fragmenty (oligosacharidy). Zbytek řetězce rozštěpí  $\alpha$ -glukozidáza a uvolní se-nitrofenol. V konečné fázi je může být substrát rozštěpen až na glukózu.



# Izoenzymy AMS

- SLINNÝ
- PANKREATICKÝ

MAKROAMYLÁZOVÝ komplex = komplexy glykosylovaných izoenzymů s imunoglobulíny a jinými bílkovinami v séru ( $M_r = 400\,000$  až  $2\,000\,000$ )

- Způsobuje zvýšení hodnot AMS v krevním séru bez patologických příznaků

Metody stanovení

1. Selektivní INHIBICE izoenzymů monoklonálními protilátkami - takto stanovení **pankreatické AMS** - referenční rozmezí: **0,22 – 0,88  $\mu\text{kat/l}$**

2. ELEKTROFORÉZA (pankreatická + slinná)

# Lipáza (LPS)

*triacylglycerol-acylhydrolasa, EC 3.1.1.3.*

## **LPS katalyzuje reakci**

triacylglycerol + 3H<sub>2</sub>O → glycerol + 3 mastné kyseliny (LPS)  
postupně

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

# LPS

**Referenční rozmezí:** **0,22 - 1,00  $\mu\text{kat/l}$**  (platí pro metodu Roche)  
do 3,3  $\mu\text{kat/l}$  (turbidimetrie)

**Klinický význam:**

- detekce a vyloučení akutní pankreatitidy
- chronická pankreatitida
- obstrukce pankreatického traktu

# Stanovení LPS

Materiál: sérum, plasma, punktát

**Referenční metoda:** není k dispozici

**Rutinní metody:**

**a) Fotometrie**

substrát :

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

**DGGR ↔ glutarová kyselina + 6'-methylresorufin (LPS)**

FOTOMETRICKY: Nárůst absorbance METHYLRESORUFINU při 580 nm

substrát : 1,2-DIGLYCERID

**1,2-diglycerid + H<sub>2</sub>O ↔ glycerol + mastná kyselina (LPS)**

**glycerol + ATP → glycerol-3-fosfát + ADP (GK)**

**glycerol-3-fosfát + O<sub>2</sub> → dihydroxyacetonfosfát + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (GPO)**

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4-aminoantipyrin + fenol → chinonmonoiminové barvivo + H<sub>2</sub>O (peroxidáza)**

FOTOMETRICKY: Nárůst absorbance barevného produktu

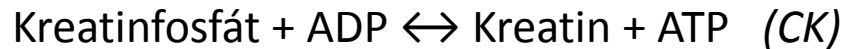
**b) Turbidimetrické metody**

# Kreatinkináza (CK)

*ATP-kreatin N-fosfotransferasa, EC 2.7.3.2.*

**Kreatinkináza katalyzuje defosforylaci kreatinfosfátu v přítomnosti komplexu ADP-Mg<sup>2+</sup> (a opačně)**

- Kreatinfosfát - důležitá rezerva energie ve svalu
- Tvorbou ATP dodává energii pro svalovou práci



CK přítomna v cytoplazmě a mitochondriích buněk kosterního svalstva, srdce, mozku a hladké svalovině, ne v erytrocytech

Izoenzymy:

v myokardu: 80% CK-MM a 20% CK-MB

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

# CK

**Referenční rozmezí:**    **M <3,12  $\mu$ kat/l**  
                                  **Ž <2,87  $\mu$ kat/l**

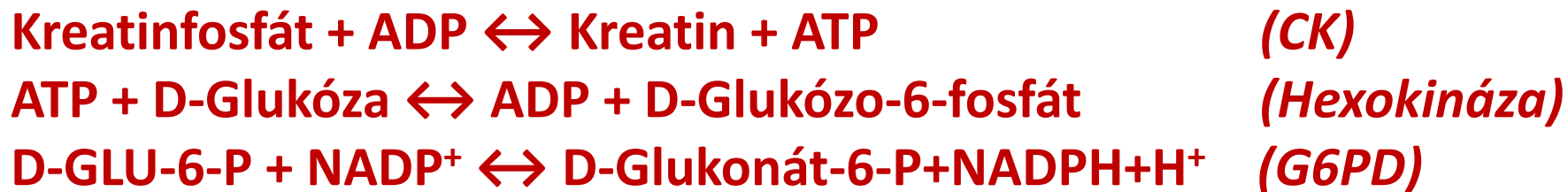
**Interference:** Při hemolýze ruší adenylkináza z erytrocytů

## **Klinický význam:**

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

# Stanovení CK – doporučená metoda

Materiál : sérum, plasma



FOTOMETRICKY - nárůst absorbance NADPH při 340 nm

Po odběru krve - CK rychle inaktivována oxidací SH-skupin

Reaktivace při stanovení: 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)



# Stanovení izoenzymů CK

## **IMUNOCHEMICKY - CK-MB mass** (hmotnostní koncentrace)

- je kardiospecifická
- vyšší analytická citlivost stanovení

## IMUNOINHIBIČNĚ - aktivita CK-MB (**neprovádí se**)

- založeno na inhibici M-podjednotek protilátkou

# Cholinesterázy (CHE)



- **Acetylcholinesterázy**



- obsaženy v erytrocytech, mozku, plicích; štěpí acetylcholin (nervová zakončení)

- **Pseudocholinesterázy** (butyrylcholinesterázy) pocházejí z ribosomů jaterních buněk → krev → sérum, plazma - stanovuje se na biochemii

# CHE

## Referenční rozmezí:

**(40-110r) 89-215  $\mu$ kat/l**

## Klinický význam:

- otravy organofosfáty a karbamáty (nekompetetivní inhibitory cholinestráz)
- poruchy proteosyntézy - těžké hepatopatie - hladovění organismu
- vrozené chybění, atypické varianty

*Patologické je především snížení aktivity*

# Stanovení CHE

Materiál : sérum, plasma

**Chybí referenční metoda**

**butyrylthiocholin + H<sub>2</sub>O → thiocholin + butyrát (CHE)**

**thiocholin + DTNB → 5-merkapt-2-nitrobenzoová kyselina**

***žluté zbarvení***

*DTNB = kyselina 5,5'-dithio-bis-nitrobenzoová*

# Enzymy -Tumorové markery

- **NSE (neuronspecifická enoláza)**  
cytoplazmatický, glykolytický izoenzym enolázy - katalyzuje  
přeměnu 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát  
*malobuněčný karcinom plic*
- **TK (thymidinkináza)**  
enzym podílející se na syntéze DNA ukazatel buněčné proliferace  
*hematologické malignity*

# Enzymy v medicíně

- **Ukazatele patologického stavu**  
např.: *Při poškození buněk se jejich aktivita v extracelulární tekutině zvyšuje*
- **Léčiva**
- **Analytická činidla v KB** – enzym je využit ke stanovení koncentrace substrátu  
např. *stanovení močoviny (ureáza)*  
*stanovení KM (urikáza)*

# Enzymy - ukazatele patologického stavu

- **Specifické pro plasmu** - pocházejí z orgánů (játra), aktivní v ní
  - koagulační
  - fibrinolytické (plazminogen)
  - CHE

Snížené hodnoty patologické – důsledek poruchy sekreční aktivity orgánu

- **Buněčné** - membránové (ALP)
  - cytosolové (ALT, LD)
  - mitochondriální (CK)
- **Secernované** - AMS, lipáza, trypsinogen

# **Patologické zvýšení aktivity nebo koncentrace enzymů v plasmě**

- **Uvolněním z buněk**
- **Sníženou rychlostí eliminace enzymu z oběhu ( dostatečně neodchází močí)**
- **Uvolněním enzymu z vazby, která ho v cirkulaci blokovala**



# Interpretace biochemických nálezů

- **Kámen žlučníku**
- **Chronická pankreatitida**
- **Virová hepatitida**
- **Alkoholismus**
- **Otrava houbami**
- **Makroamylazémie**