

ÚLOHA Č.2 – STANOVENÍ ENZYMŮ

A) URČENÍ JATERNÍCH ENZYMŮ – ALT, AST

Poruchy metabolismu jater se projevují ve změnách koncentrací některých nízkomolekulárních látek (typicky bilirubinu) v krevním séru a zejména hladin některých enzymů.

Bilirubin, který se tvoří v RES převážně z hemoglobinu, je špatně rozpustný, a proto je tělními tekutinami transportován do jater vázaný na albumin (nekonjugovaný bilirubin). V buňkách jaterního parenchymu se na jednu nebo obě propionové kyseliny bilirubinu váže kys. glukuronová - tzv. konjugovaný bilirubin. Kromě obvyklé reversibilní vazby se může bilirubin vázat na albumin kovalentně (Δ -bilirubin), který koluje v organismu, dokud nedojde k vyloučení samotného albuminového nosiče z organismu. Obsah konjugovaného bilirubinu se zvyšuje zejména při závažných chorobách jater (ikterus), zvýšená hladina nekonjugovaného bilirubinu je známkou zvýšené hemolýzy.

γ -glutamyltransferasa (GGT, GMT) je enzym vázaný na membrány, typický pro orgány parenchymového typu – vyskytuje se zejména v ledvinách, pankreatu a játrech. Pro klinickou praxi má význam prakticky jen enzym z jater a žlučových cest, které mají charakter cholestase (např. obstrukce žlučových cest); je to jeden z hlavních ukazatelů požití alkoholu.

Aminotransferasy (transaminasy) ALT (GPT) i AST (GOT) jsou velmi důležité pro diagnostiku jaterních nemocí. Aktivita AST v séru bývá zvýšena i při jiných chorobách zejména při infarktu myokardu. Z poměru aktivit ALT a AST je možné usuzovat i na hloubku poškození orgánů – ALT je cytoplazmatický enzym, zatímco AST je lokalizován v cytoplazmě a zčásti v mitochondriích.

Úkol: Stanovte aktivity obou enzymů (ALT, AST) ve vzorku kity Bio-la-test fy Lachema.

B) STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY ALKALICKÉ FOSFATASY

Alkalická fosfatasa v séru pochází především z kostní tkáně (osteoblastů) a mikrosomů jaterních buněk, její aktivita v séru stoupá v důsledku nemocí těchto orgánů. Jako jeden z mála enzymů je alkalická fosfatasa vylučována žlučí do trávicího traktu, její zvýšená hladina v séru tedy může indikovat sníženou průchodnost žlučových cest (cholestasis). Aktivita tohoto enzymu se určuje nejčastěji na základě jeho schopnosti štěpit syntetický substrát *p*-nitrofenylfosfát, produkt *p*-nitrofenol má intenzivní žluté zbarvení.

Úkoly:

Změřte aktivitu alkalické fosfatasy několika níže uvedenými způsoby, současně posuďte vliv aktivátoru a inhibitoru.

Reagencie:

roztok 1: 5.5 mM *p*-nitrofenylfosfát v glycinovém pufru

roztok 2: 5.5 mM *p*-nitrofenylfosfát + 1 mM MgSO₄ v glycinovém pufru

roztok 3: 5.5 mM *p*-nitrofenylfosfát + 0.1 M KH₂PO₄ v glycinovém pufru

1. *Dvoubodové stanovení*

Postupujte podle následujícího schématu :

	vzorek	blank
roztok substrátu (roztok 1)	1 ml	1 ml
sérum	0.1 ml	–

inkubujte 30 minut při laboratorní teplotě

0.02 M NaOH	10 ml	10 ml
sérum	–	0.1 ml

Po promíchání změřte absorbanci proti blanku při 400 nm.

Současně proveďte stanovení s aktivátorem – Mg²⁺ ionty (roztok 2) a inhibitorem – fosfátem (roztok 3). Vypočtete aktivitu alkalické fosfatasy v kataltech, jestliže extinkční koeficient $\epsilon = 18.8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Posuďte vliv inhibitoru a aktivátoru.

C) ISOENZYMY LAKTÁTDEHYDROGENASY (LD)

Pro diferenciální diagnostiku poruch různých orgánů má velký význam posouzení aktivit některých orgánově selektivních enzymů a zejména izoenzymů. V této úloze je demonstrován jeden z přístupů používaný při analýze izoenzymového spektra v krevním séru – při stanovení laktátdehydrogenasy (LD, LDH) je využito odlišné substrátové specifity izoenzymů. V jiných případech lze využít např. specifické inhibice jednoho izoenzymu protilátkou (kreatinkinasa).

Tetramer LD vytváří 5 izoenzymů kombinací dvou typů podjednotek H (heart) a M (muscle): LD₁ (H₄), LD₂ (H₃M), LD₃ (H₂M₂), LD₄ (H₃M) a LD₅ (M₄). K separaci a kvantifikaci jednotlivých izoenzymů se používají elektroforesa, ionexová chromatografie, resp. imunoprecipitace; jinou možností je právě využití různé substrátové specifity těchto izoenzymů. Distribuce izoenzymů v krevním séru: LD₁ 18-33 %, LD₂ 28-40 %, LD₃ 18-30 %, LD₄ 6-16 % a LD₅ 2-13 %.

Izoenzym LD₁ je vedle laktátu schopen poměrně účinně oxidovat i 2-oxobutyát (α -hydroxybutyrát), chová se tedy jako α -hydroxybutyrátdehydrogenasa (HBD). Tento izoenzym se vyskytuje především v srdeční tkáni, jeho stanovení má hlavní význam při diagnostice infarktu myokardu. V játrech a plicích je tohoto izoenzymu poměrně málo, nezanedbatelné aktivity však lze najít i v kosterním svalstvu, ledvinách a erytrocytech.

Úkoly:

a) Stanovení celkové aktivity LD v séru

Proved'te stanovení celkové aktivity LD pomocí kitů fy Lachema (Bio-la-test) či Chemelex.

b) Stanovení HBD v séru

Při vlastním stanovení postupujte podle návodu v setu fy Sevac či Reanal. Vyhodnot'te podíl izoenzymu LD₁ na celkové aktivitě LD ve vašem vzorku.