

## STANOVENÍ KATALYTICKÉ KONCENTRACE ENZYMŮ

---

---

---

---

---

---

---

---

### Enzymy

- Biokatalyzátory
- Snižují aktivační energii potřebnou pro chemickou reakci
- V klinické biochemii se enzymy používají:
  - ▶ pro diagnostické účely
  - ▶ jako reagenty

#### Názvosloví

- ▶ triviální / historické TRYPSIN
- ▶ obecně užívané  $\alpha$ -AMYLASA ( AMS)
- ▶ vědecké 1,4- $\alpha$ -D-glukanglukanohydrolasa EC 3.2.1.1.

- ▶ faktory ovlivňující enzymovou reakci :  
TEPLOTA, pH, koncentrace SUBSTRÁTU, koE,...

**často se volí kompromis mezi optimálními podmínkami, cenou, technickými požadavky**

---

---

---

---

---

---

---

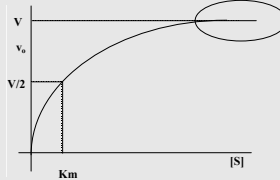
---

### Enzymy - stanovení

Rovnice Michaelis-Mentenové:

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$$[S] \gg K_m \quad v = V_{\text{lim}}$$



**Ideálně:  $[S] \geq 100 K_m$**

cena, rozpustnost, inhibice nadbytkem substrátu, ...

---

---

---

---

---

---

---

---

### Enzymy - stanovení

#### 1) Dvoubodové stanovení („metoda zastaveného času“)

fotometrické sledování změny absorbance (přírůstek produktu nebo úbytek substrátu) za časovou jednotku (nevíme, co se v reakční směsi děje!), většinou v daném čase zastavujeme enzymovou reakci (např. denaturace a kolorimetrické vybarvení produktů)

$$\Delta A / \Delta t = \frac{A_2 - A_1}{t_2 - t_1} \quad A_1, t_1 \text{ většinou rovny } 0 \text{ (počátek)}$$

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Enzymy - stanovení

#### 1) Dvoubodové stanovení („metoda zastaveného času“)

fotometrické sledování změny absorbance (A) za časovou jednotku

#### 2) „KINETICKÁ“ stanovení („metoda tangent“)

fotometrické sledování tvorby produktu nebo úbytku substrátu v čase (dA/dt)

podmínka:

- ▶ konstantní rychlost (kinetika 0.řádu)
- ▶ vždy kontrolovat průběh reakce !

t.j. rychlost reakce

---

---

---

---

---

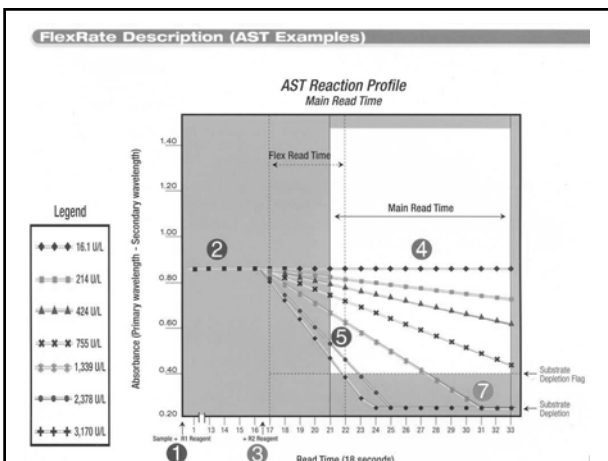
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Enzymy - stanovení

2) „KINETICKÉ“ testy nejčastěji fotometrické s využitím

▶ optického testu (Warburgův) (NADH + H<sup>+</sup>) 340 nm

▶ chinoniminové reakce (křenová peroxidasa)

POD

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4-aminoantipyrin + subst. fenol → chinonimin (červený, 555 nm)

**KATALYTICKÁ KONCENTRACE ENZYMU** μkat/l

(dříve, ale ještě např. v Německu, USA U/l) 1 μkat/l = 60 U/l

---

---

---

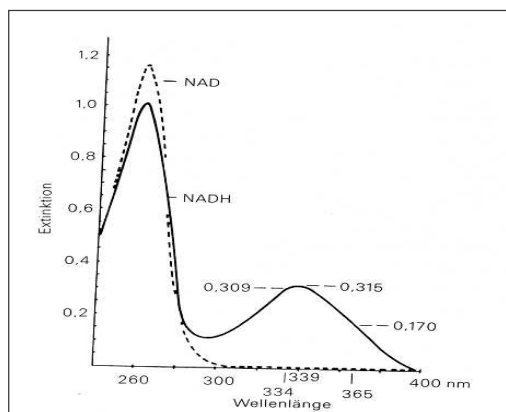
---

---

---

---

---



---

---

---

---

---

---

---

---

### Enzymy - stanovení

1 a 2) „KINETICKÉ“ a „dvoubodové“ metody  
fotometrické sledování časové změny absorbance (A)  
t.j. rychlost reakce

jednotky μkat/l

3) **IMUNOCHEMICKÉ metody**

stanovujeme hmotnostní koncentraci enzymu

jednotky μg/l

---

---

---

---

---

---

---

---

### ALT

#### Klinický význam:

- onemocnění jater ( akutní virová hepatitida)
- onemocnění žlučových cest
- dekompenzované srdeční vady (venostasa v játrech)

Je obsažena v cytoplasmě všech buněk ( zvláště hepatocytů)

---

---

---

---

---

---

---

---

### ALT

- L-alanin + 2-oxoglutarát --> pyruvát + L-glutamát
- pyruvát + NADH + H<sup>+</sup> --> L-laktát + NAD<sup>+</sup>

- pyruvát + NADH + H<sup>+</sup> --> L-laktát + NAD<sup>+</sup>  
endogenní
  - pyridoxal-5-fosfát + ApoALT --> ALT\*
- doporučuje se předinkubace 10 min při +37°C
- start : 2-oxoglutarát ( 2 činidlová metoda)
- start : sérum ( 1 činidlová metoda)
- kalibrace: enzymový kalibrátor nebo teoretický faktor

---

---

---

---

---

---

---

---

### AST

#### Klinický význam:

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

Je obsažena v cytoplasmě(30%) a v mitochondriích(70%) všech buněk ( zvláště hepatocytů, buněk srdečního svalu, ledvin a kosterních svalů)

---

---

---

---

---

---

---

---

### AST

- L-aspartát + 2-oxoglutarát --> oxalacetát + L-glutamát
- oxalacetát + NADH + H<sup>+</sup> --> L-malát + NAD<sup>+</sup>

- pyruvát + NADH + H<sup>+</sup> --> L-laktát + NAD<sup>+</sup>  
endogenní
  - pyridoxal-5-fosfát + ApoAST --> AST\*
- doporučuje se předinkubace 10 min při +37°C
- start : 2-oxoglutarát ( 2 činidlová metoda)
- start : sérum ( 1 činidlová metoda)
- kalibrace: enzymový kalibrátor nebo teoretický faktor

---

---

---

---

---

---

---

---

### LD

#### Klinický význam:

- onemocnění srdečního svalu (infarkt myokardu)
- onemocnění svalů
- další choroby (hemolytická anémie, leukémie, onemocnění jaterního parenchymu,...hemolýza)

LD je cytoplasmatický enzym, katalyzuje reakci anaerobní glykolýzy, to vysvětluje nález LD prakticky ve všech tkáních.

---

---

---

---

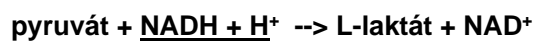
---

---

---

---

### LD



Je to TETRAMER skládající se ze 2 podjednotek: M ( muscle)  
H (heart)

Kombinací vzniká 5 isoenzymů : LD1 H4  
LD2 H3M  
LD3 H2M2  
LD4 HM3  
LD5 M4

---

---

---

---

---

---

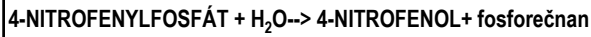
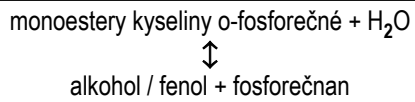
---

---





### ALP



---

---

---

---

---

---

---

---

### ALP a izoenzymy

#### METODY

- N-methyl-D-glucamin (MEG) (v ČR stand.metoda)
- 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP) (IFCC metoda)
- Diethanolamin (DGKC)
- IMUNOCHEMICKY (kostní izoenzym)
- ELEKTROFORÉZA
- INAKTIVAČNĚ - INHIBIČNÍ metody
- srážení LEKTINEM (kostní izoenzym)

ALP v rozpuštěných lyofilizátech je nutné reaktivovat (2h při lab.teplotě)

---

---

---

---

---

---

---

---

### GMT

#### Klinický.význam:

- onemocnění jater
- obstrukce žlučových cest
- sekundární nádory jater
- monitorování chronického alkoholismu

GMT je vázána na cytoplasmatické membrány.

V krvi dokazatelný enzym je jen jaterního původu.

---

---

---

---

---

---

---

---



### GMT / GGT

Katalyzuje přenos  $\gamma$ -glutamylového zbytku z  $\gamma$ -glutamylpeptidů na jiný akceptor ( např. peptid nebo aminokyselina)

### METODY

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

GLUCANE + Glygly  $\rightarrow$  GLU-Glygly + 5-A-2NB  
**5-AMINO-2-NITROBENZOÁT**

GLU-4-NA + Glygly  $\rightarrow$  GLU-Glygly + 4-NA  
**4-NITROANILID**

---

---

---

---

---

---

---

---

### AMS

#### Klinický význam:

- onemocnění pankreatu (akutní pankreatitida, 5-12h)
- onemocnění slinných žláz ( parotitis)
- přítomnost makroamylasového komplexu  
MAKROAMYLASOVÝ komplex = komplexy glykosylovaných isoenzymů s imunoglobuliny a jinými bílkovinami v séru Mr = 400 000 až 2 000 000
- AMS je sekreční enzym vytvářený pankreatem, slinnými žlázami, část vzniká v játrech, plicích.

Sérum obsahuje přibližně stejnou katalytickou koncentraci pankreatického a slinného izoenzymu.

---

---

---

---

---

---

---

---

### AMS

- POLYSACHARIDY  $\rightarrow$  OLIGOSACHARIDY  $\rightarrow$  MALTOSA  
štěpí  $\alpha$ -1,4 glykosidické vazby

### • METODY

- AMYLOKLASTICKÉ  
ŠKROB  $\rightarrow$  OLIGOSACHARIDY  $\rightarrow$  MALTOSA  
+ roztok jodu  
modré zbarvení
- CHROMOLYTICKÉ  
Substrát = nerozpustný škrob s kovalentně vázaným barvivem

---

---

---

---

---

---

---

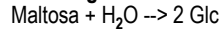
---

### AMS

#### s MOLEKULÁRNĚ DEFINOVANÝMI SUBSTRÁTY

▶ substráty značené 4-nitrofenolem na konci definovaného oligosacharidu

#### $\alpha$ -glukosidasa



▶ metoda IFCC

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



▶ 2-chloro-4-nitrofenyl- $\alpha$ -D-maltotriosid

---

---

---

---

---

---

---

---

### LPS

#### Klinický.význam:

- detekce a vyloučení akutní pankreatitidy
- chronická pankreatitida ( relapsující)
- obstrukce pankreatického traktu

---

---

---

---

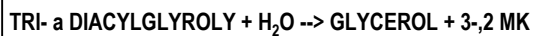
---

---

---

---

### LPS

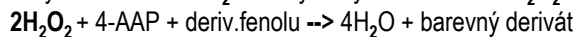
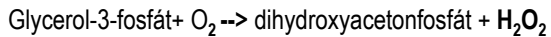


#### METODY

• TITRAČNÍ ( stanovení MK)

• TURBIDIMETRICKÉ ( snížení zákalu)

• „fotometrické“ ( stanovení glycerolu)



micelární komplexy „nerozpustný substrát-kolipasa-  
žlučová kyselina (pH 9)

poznámka: LPS pankreatická a jaterní, lipoproteinová LPS

---

---

---

---

---

---

---

---

### ACP

#### Klinický.význam:

- onemocnění prostaty ( karcinom)
- některá kostní onemocnění (tumory a metastasy)
- chronická ledvinná nedostatečnost
- V séru lze dokázat prostatický a kostní isoenzym, dále malé množství jaterního, erytrocytárního a trombocytárního isoenzymu.

ACP není v séru/plazmě stabilní !

ACPP je pro dg.ca prostaty nahrazováno imunochemickým stanovením **PSA**

---

---

---

---

---

---

---

---

### ACP

#### METODY

- pH < 7,0
- 4-NITROFENYLFOSFÁT + H<sub>2</sub>O--> 4-NITROFENOL+ fosforečnan
- 1-NAFTYLFOSFÁT + H<sub>2</sub>O--> 1-NAFTOL + fosforečnan  
1-NAFTOL + diazoniová sůl --> azobarvivo
- detekce prostatického isoenzymu:  
ACP - ACP inhibovaná vlnanem

---

---

---

---

---

---

---

---

### CHE

#### Klinický.význam:

CHE vzniká v ribosomech jaterních buněk a je secernována do krve. Patologické je především snížení aktivity.

- poruchy proteosyntézy  
těžké hepatopatie  
hladovění organismu
- intoxikace organofosfáty  
nekompetitivní inhibitory
- vrozené deficity, atypické varianty

---

---

---

---

---

---

---

---

**CHE**

estery CHOLINU + H<sub>2</sub>O --> CHOLIN + příslušná kyselina

Sérum / plazma

•ACETYLCHOLINESTERASA (substrát: acetylcholin)

je obsažena v Ery, mozku

•PSEUDOCHOLINESTERASA

pochází z ribosomů jaterních buněk

thioestery cholinu + H<sub>2</sub>O --> thiocholin + butyrát

thiocholin + DTNB -->5-merkapt-2-nitrobenzoová kyselina

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

---

---

---

---

---

---

---

---

**Enzymy v moči**

1. NAG ( N-acetyl-beta-glukosaminidasa)  
TUBULÁRNÍ postižení LEDVIN

2. GMT

---

---

---

---

---

---

---

---