

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
- $\mu\text{g/l}$, 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**

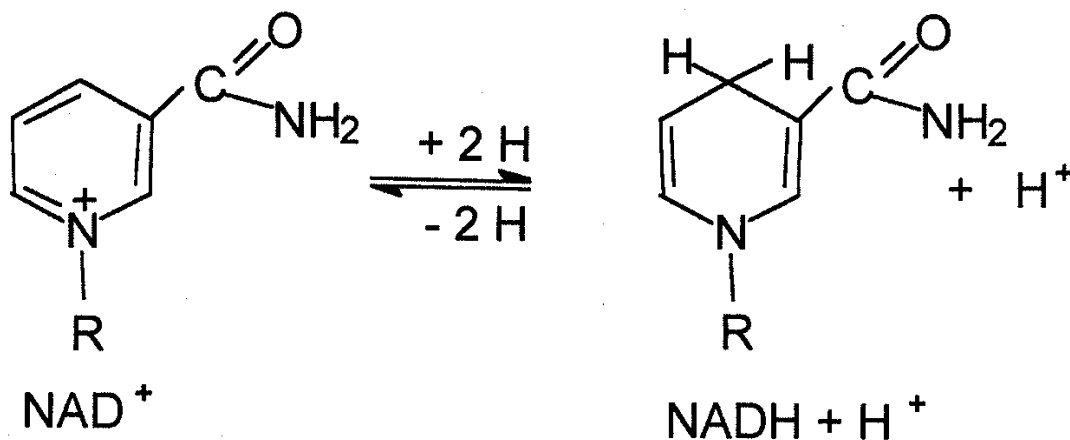
Doporučené metody

Enzym	Referenční metoda	Certifikovaný referenční materiál
ALP	IFCC metoda	JC ERM 20327
AMS	IFCC metoda	ERM-AD456 (IRMM Geel); JC-ERM 2032
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

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 μ kat/l

Ž 0,20 - 0,60 μ 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⁺ <--> L-laktát + NAD⁺ (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 μ kat/l

Ž 0,17 - 0,60 μ kat/l

Interference:

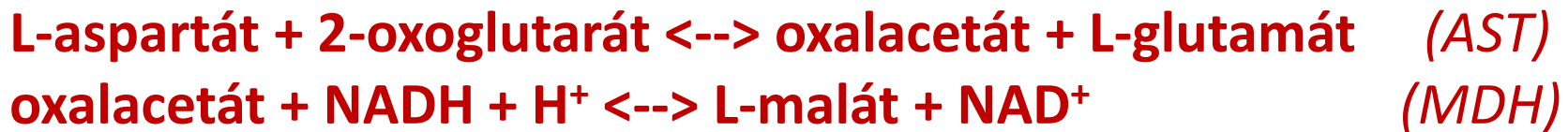
Výsledky ovlivňuje hemolýza - aktivita AST 40x vyšší v erytrocytech než v séru

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



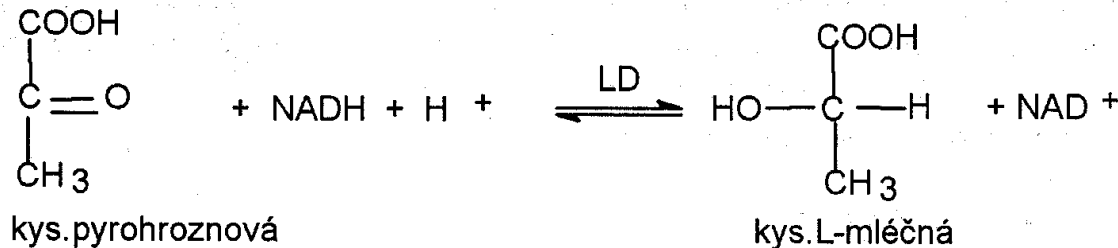
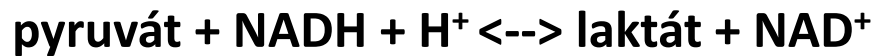
FOTOMETRICKY - **pokles absorbance NADH při 340 nm**

- 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⁺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 μ 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 – *vyjímečně*

Alkalická fosfatáza (ALP)

orthofosfát: monoesterfosfohydroláza, alkalické optimum, EC 3.1.3.1.

ALP katalyzuje reakci:

monoester kyseliny o-fosforečné + H₂O ↔ alkohol/fenol + fosforečnan (hydrolýza)

R-OPO(OH)₂ + R'-OH ↔ R-OH + R'-OPO(OH)₂ (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 μ kat/l
(1-18r) 1,35-7,50 μ kat/l

Ž (18-120r) 0,58 - 1,75 μ 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 γ -glutamylového zbytku z γ - glutamylpeptidů na jiný akceptor (např. peptid nebo aminokyselinu)**
- **GMT je vázána na cytoplasmatické membrány epitelu žlučových cest, ledvinných tubulů, jater, pankreasu, střeva, erytrocytů,...)**
- **V krvi dokazatelný enzym je převážně jaterního původu**

GGT

Referenční rozmezí: **M 0,17 - 1,19 μ kat/l**
Ž 0,10 - 0,70 μ 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

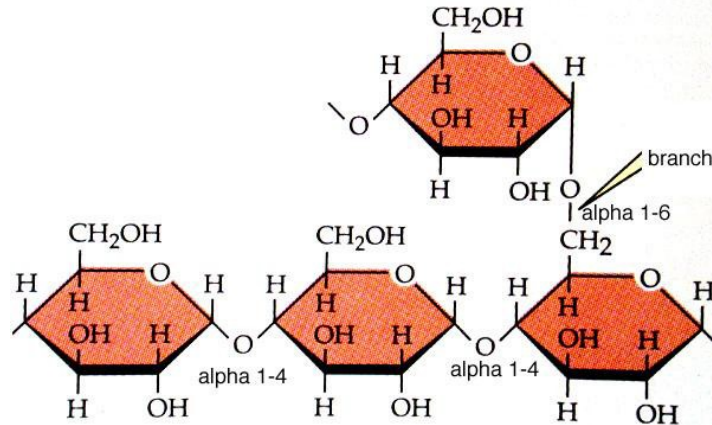
Glucane + Glygly \leftrightarrow 5-A-2NB + Glu-GlyGly (GGT)

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

α -amyláza (AMS)

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

AMS štěpí α -1,4 glykozidické vazby



Polysacharidy + H₂O → 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)- α -(1,4)-D-maltoheptaosid

EPS-G7-PNP + H₂O \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 α -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 + 3H₂O → 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 + H₂O ↔ glycerol + mastná kyselina (LPS)

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

glycerol-3-fosfát + O₂ → dihydroxyacetonfosfát + H₂O₂ (GPO)

H₂O₂ + 4-aminoantipyrin + fenol → chinonmonoiminové barvivo + H₂O (peroxidáza)

FOTOMETRICKY: Nárůst absorbance barevného produktu

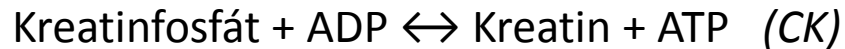
b) Turbidimetrické metody

Kreatinkináza (CK)

ATP-kreatin N-fosfotransferasa, EC 2.7.3.2.

Kreatinkináza katalyzuje defosforylaci kreatinfosfátu v přítomnosti komplexu ADP-Mg²⁺ (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 μ kat/l**
 Ž <2,87 μ kat/l

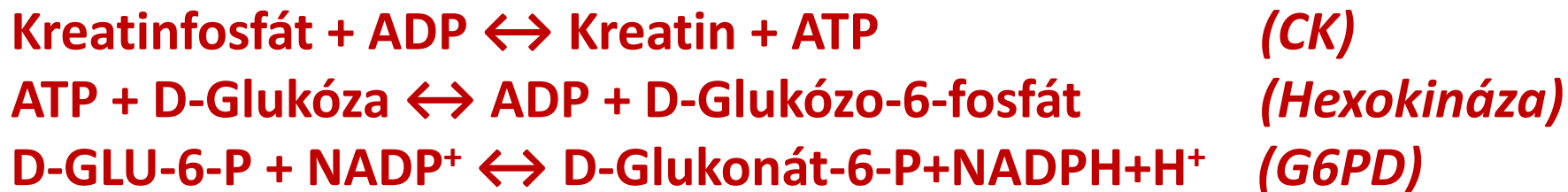
Interference: Při hemolýze ruší adenylkináza z erytrocytů

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)

estery CHOLINU + H₂O → CHOLIN + příslušná kyselina (CHE)
hydrolýza

- **Acetylcholinesterázy**

acetylcholin + H₂O → CHOLIN + CH₃COOH (CHE)

- 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 μ 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 + H₂O → 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**