

ÚLOHA Č.2 – STANOVENÍ ENZYMŮ

(studenti pracují ve dvojicích)

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 cytoplasmě a zčásti v mitochondriích.

Úkol: Stanovte aktivity obou enzymů (ALT, AST) ve vzorku pomocí komerčních kitů (před vlastním stanovením si řádně přečtěte příložené návody).

Do protokolu uveďte princip stanovení, jakým kitem bylo stanovení provedeno, tabulku naměřených hodnot, všechny výpočty, fyziologické hodnoty a hodnoty deklarované pro

kontrolní sérum. Okomentujte naměřené výsledky ve vztahu k fyziologickým a deklarovaným hodnotám a přesnost vlastní práce.

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:

	blank	1. vzorek neznámého séra	2. vzorek nez. séra (s aktivátorem)	3. vzorek nez. séra (s inhibitorem)	Vzorek kontrolního séra
Roztok substrátu	1ml roztoku 1	1ml roztoku 1	1ml roztoku 2	1ml roztoku 3	1ml roztoku 1
sérum	-	0,2ml	0,2ml	0,2ml	0,2ml kontrolního séra
Inkubace 30 – 45 minut při laboratorní teplotě.					
0,02 M NaOH	10ml	10ml	10ml	10ml	10ml
neznámé sérum	0,2ml	-	-	-	-

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.

Do protokolu uveďte princip stanovení (rovnici reakce), jakým kitem bylo stanovení provedeno, tabulku naměřených hodnot, všechny výpočty, fyziologické hodnoty a hodnoty deklarované pro kontrolní sérum. Okomentujte naměřené výsledky ve vztahu k fyziologickým a deklarovaným hodnotám a přesnost vlastní práce.

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-oxobutyrate (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 komerčního kitu (před vlastním stanovením si řádně přečtete příložený návod).

b) Stanovení HBD v séru

Proved'te stanovení aktivity HBD pomocí komerčního kitu (před vlastním stanovením si řádně přečtete příložený návod). Vyhodno'te podíl izoenzymu LD₁ na celkové aktivitě LD ve vašem vzorku.

Do protokolu uveďte princip stanovení (rovnici reakce), jakým kitem bylo stanovení provedeno, tabulku naměřených hodnot, všechny výpočty, fyziologické hodnoty a hodnoty deklarované pro kontrolní sérum. Okomentujte naměřené výsledky ve vztahu k fyziologickým a deklarovaným hodnotám a přesnost vlastní práce.

Závěr: Do protokolu stručně shrňte všechny výsledky z tohoto cvičení.

Doplňující otázky:

- Co vyjadřuje Warburgův optický test? Vyjádři i rovnicí. (2 body)
- Co znamená „dvoubodové stanovení“ u stanovení enzymů? (2 body)
- Co vyjadřuje 1 katal? (1 bod)