

# Stanovení vybraných enzymů

Roman Kand'ár

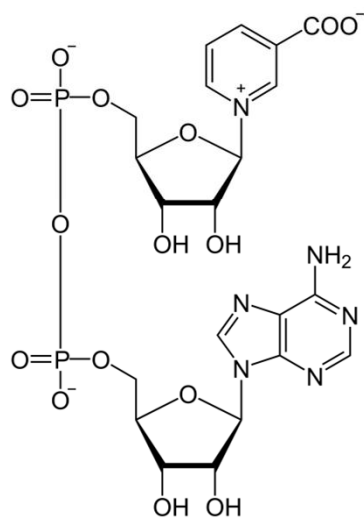


- Takže prvně malé opakování
- **ENZYM**
  - Protein (RNA) s katalytickou aktivitou
  - Protein (RNA) + kofaktor (prosthetická skupina, koenzym)
    - Jaký je vlastně rozdíl mezi prosthetickou skupinou a koenzymem ?
  - **Prosthetická skupina**
    - stabilní součástí enzymu
  - **Koenzym**
    - snadno disociuje

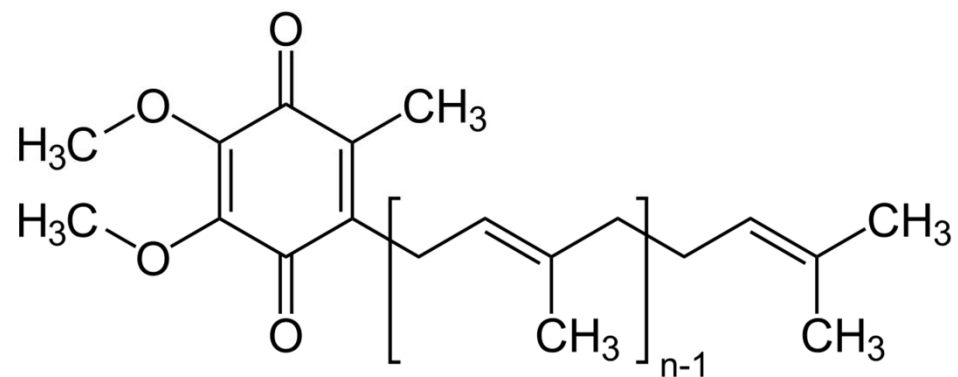
– Příklady kofaktorů:

- **NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, FMN, FAD, lipoát, benzochinony (CoQ<sub>10</sub>), biopterin, hem, glutathion, PLP, koenzym A, TPP, biotin, THF, methylkobalamin, SAME, ATP, PAPS, Ac-CoA, ...**
- **To je zkratek, takže připomenout, zopakovat**
- **Musíme umět vzorce těch kofaktorů ?**
  - **Netřeba, ale poznat byste je měli !**
  - **Takže zkuste si to**

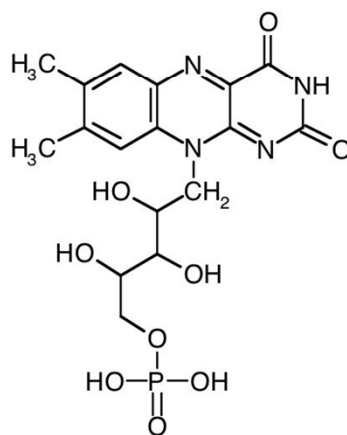




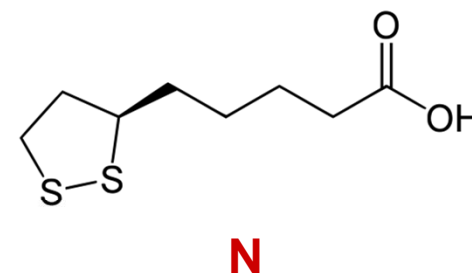
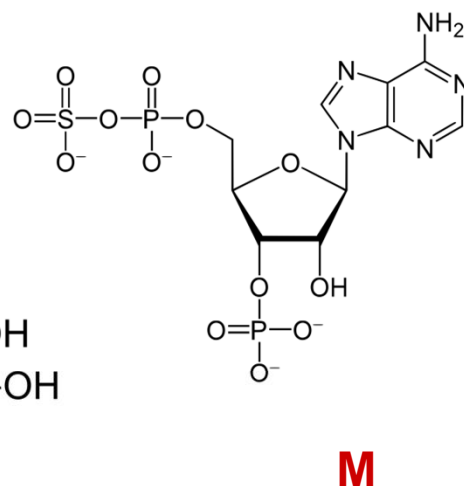
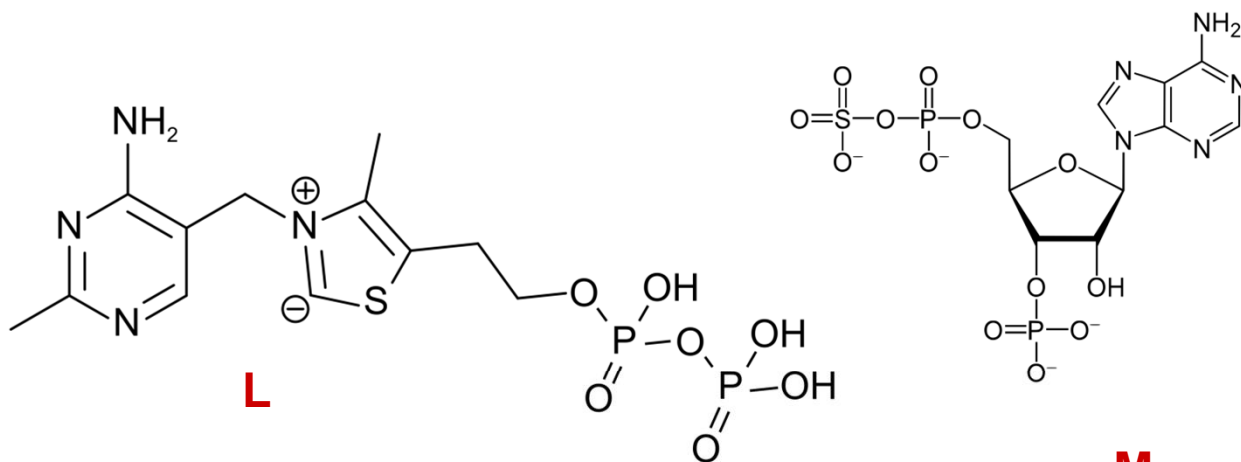
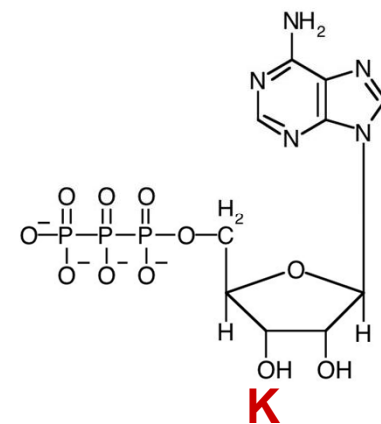
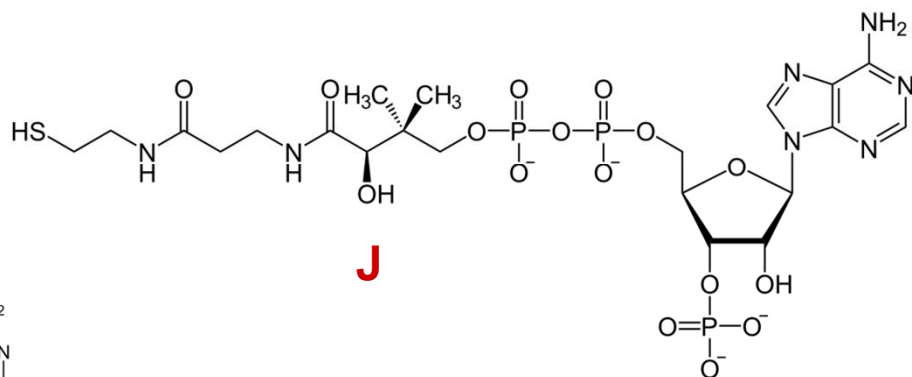
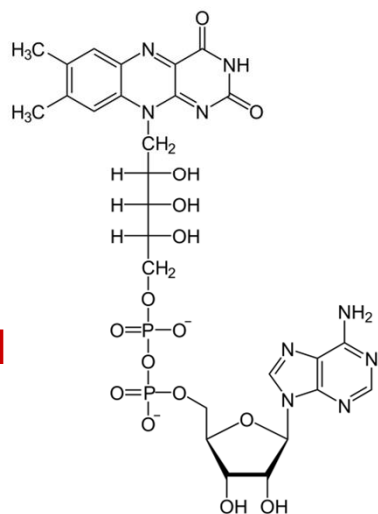
**F**



**G**



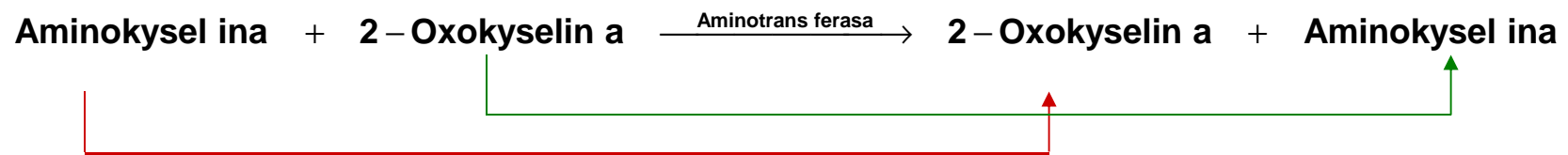
**H**



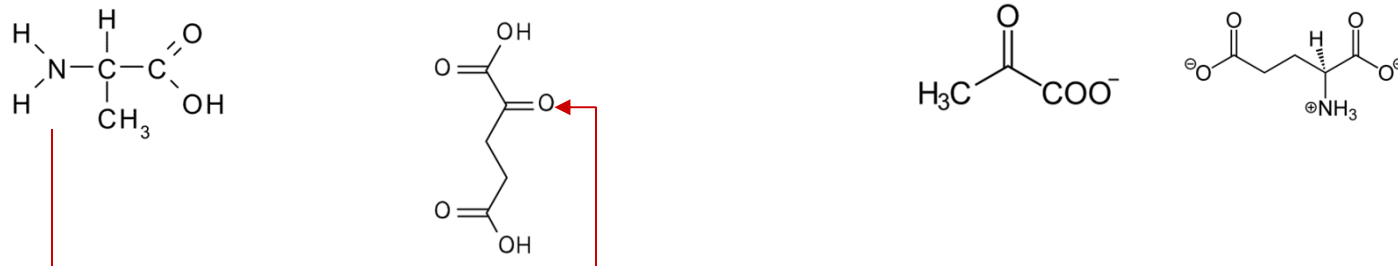
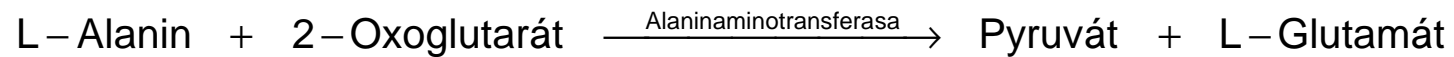


- **Nyní k diagnosticky významným enzymům**
  - ACP
  - ALT
  - ALP
  - AMS
  - AST
  - CHS
  - HBD
  - CK
  - LD
  - LPS
  
- **Princip stanovení ?**
  - Využíváme reakcí, které katalyzují
  - Je však zapotřebí, aby substrát nebo produkt významně absorbovaly v blízké UV nebo Vis
  
  - Nyní si jednotlivé reakce, katalyzované námi stanovovanými enzymy, probereme

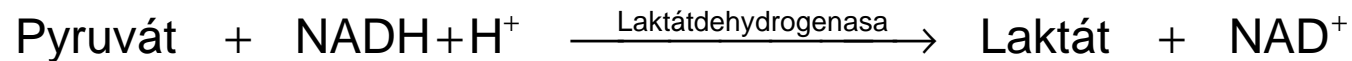
- ALT, AST
  - Jedná se o aminotransferasy, vzpomeňte na odbourávání aminokyselin
  - Hlavně se ty reakce neučte nazpaměť, pak to pletete
  - Je to jednoduché, nejdříve obecně



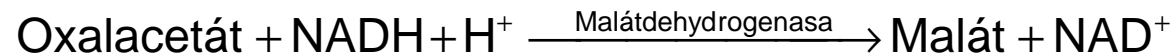
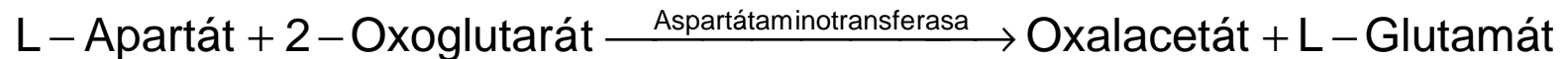
– ALT (alaninaminotransferasa)



- **Žádný z produktů ani substrátů významně neabsorbují v blízké UV nebo Vis oblasti!**
  - **Proto následuje další reakce, kde buď substrát, produkt nebo třeba kofaktor absorbují. Zde je to redukovaná forma NAD (NADH+H<sup>+</sup>), silně absorbují kolem 340 nm !**
  - **Ve výsledku je aktivita ALT úměrná poklesu absorbance NADH+H<sup>+</sup>**

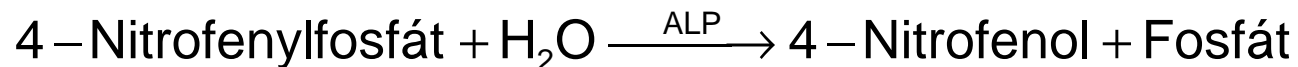


– **AST (aspartátaminotransferasa)**



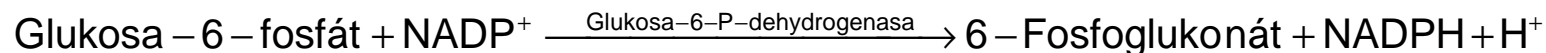
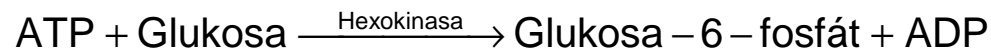
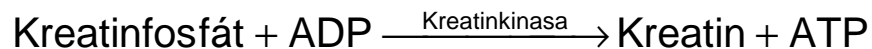
- Jak vidíte, jedná se o analogickou reakci, jako při stanovení ALT, z aspartátu vzniká odpovídající 2-oxokyselina (oxalacetát), ten je pak za katalýzy malátdehydrogenasy redukován na odpovídající 2-hydroxykyselinu (malát) a opět sledujeme úbytek NADH+H<sup>+</sup>

– **ALP (alkalická fosfatasa)**

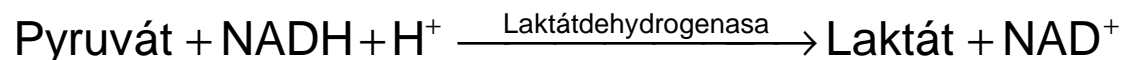
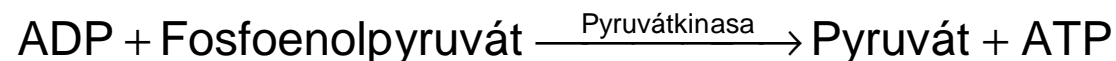
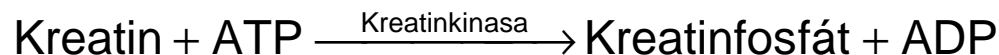


- ALP katalyzuje hydrolýzu esterů kyseliny fosforečné
- Zde je použit 4-nitrofenylfosfát, protože produkt (4-nitrofenol) významně absorbuje kolem 405 nm !

– **CK (kreatinkinasa)**

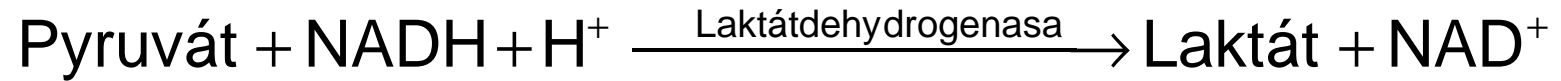


- **Aktivita CK je úměrná přírůstku absorbance NADPH+H<sup>+</sup>**
- **Zde můžeme použít i obrácenou reakci, tedy:**



- **Zde naopak je aktivita CK úměrná poklesu absorbance NADH+H<sup>+</sup>**
- **Nyní k jednotlivým reakcím:**
  - **Reakce katalyzována hexokinásou je prvním krokem glykolisy**
  - **Reakce katalyzována glukosa-6-fosfátdehydrogenásou je prvním krokem pentosového cyklu**
  - **Reakce katalyzována pyruvátkinásou je posledním krokem glykolisy**
  - **Reakce katalyzována laktátdehydrogenásou je reakcí anaerobní glykolisy**
- **Je třeba se něco učít ?**

– LD (laktátdehydrogenasa)



- To už tu několikrát bylo, že ?

- **No a jak to budeme měřit ?**
  - **Kineticky !**
    - **Tudíž to má něco společného s časem**
    - **Neměříme tedy okamžitou absorbanci, ale její změnu v čase (nejčastěji za minutu, tedy  $\Delta A/\text{min}$ )**
    - **V jakých jednotkách jsou uváděné výsledky ?**
      - **kat/l (tedy spíše  $\mu\text{kat/l}$  nebo  $\text{nkat/l}$ )**
      - **Jedná se tedy o **katalytickou koncentraci****
    - **U některých enzymů se uvádí **hmotnostní koncentrace** (např.  $\mu\text{g/l}$ ), co to znamená?**
      - **To znamená, že neměříme aktivitu toho enzymu, ale jeho množství pomocí imunochemických metod (specifická protilátka proti bílkovinné části enzymu)**
    - **A co je vlastně ten katal ?**
      - **Definice:**
        - » **Enzym má katalytickou aktivitu 1 kat, pokud je schopen při nasycení substrátem za definovaných podmínek (teplota, pH, složení, koncentrace) za přítomnosti aktivátorů a nepřítomnosti inhibitorů proměnit 1 mol substrátu za 1 sekundu**
        - » **Tedy rozměr v SI jednotkách je mol/s**

- **Jaké přístroje k měření lze použít ?**
  - **Míněny ty, které jsou na KBBV**



- **Tento spektrofotometr nelze, poněvadž nemá vyhřívaný (37 °C) kyvetový prostor**
- **Navíc je zapotřebí stopek, a to už se dostáváme někam do hodně daleké minulosti**



- **Velmi drahý spektrofotometr s diodovým polem, vhodný spíše pro výzkumné účely**



- **Devítikanálový fotometr LabSystem, náš favorit**



**Biochemické analyzátoři Cobas Mira Plus a Olympus AU640  
Samozřejmě nejvhodnější, ale k výukovým účelům méně vhodné**

- **Ještě několik poznámek**
  - **Neříkejte, že enzym stanovujeme enzymaticky**
  - **Kromě kinetického měření lze použít i tzv. „end-point“ metodu**
    - **O co se jedná ?**
      - **Neměříme změnu absorbance v čase, ale konečnou absorbanci produktu, tudíž reakce se zastaví**
      - **Příklad:**

