

Primenjena enzimologija

1a. Istraživačke laboratorije

1b. Industrija

2. Kliničke laboratorije

Klinički aspekti enzimologije

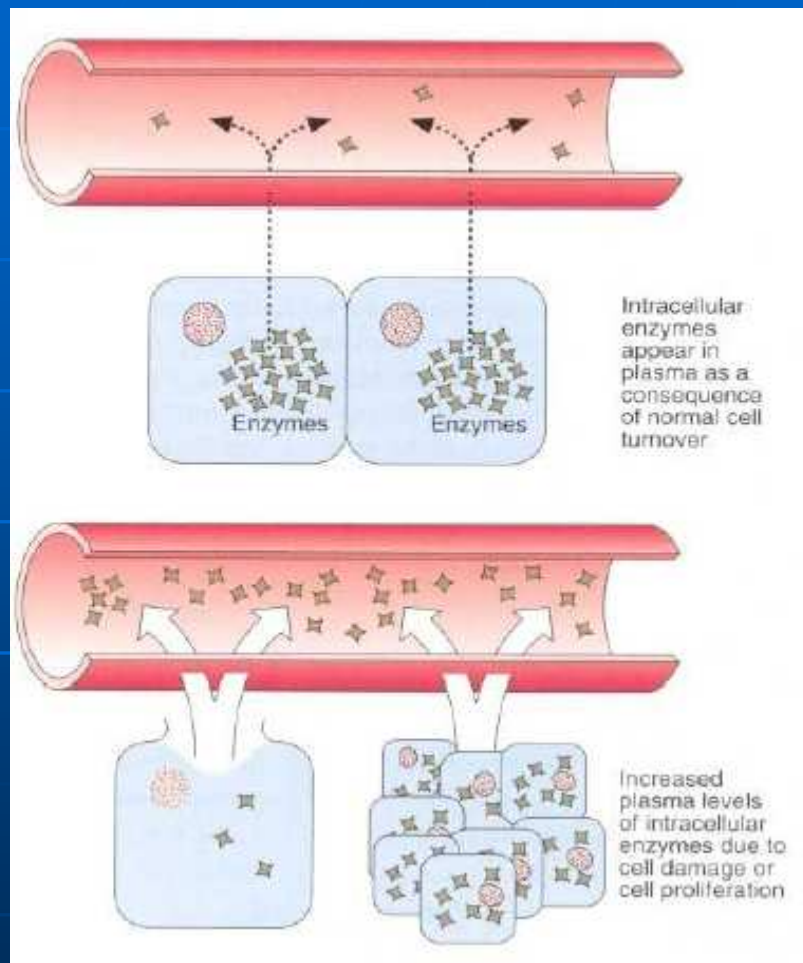
Odredjivanje enzimskih aktivnosti za kliničku dijagnostiku

- Enzim bi trebalo da bude prisutan u krvi, urinu, ili nekom lako dostupnom tkivnom fluidu.
- Enzimski test bi trebalo da bude jednostavan.
- Razlike u enzimskoj aktivnosti između normalnog i patološkog stanja bi trebalo da budu dijagnostički značajne, uz dobru korelaciju između enzimske aktivnosti i patološkog stanja.
- Poželjno je i da je enzim dovoljno stabilan.

Enzimi su prisutni u krvi kao:

- plazma-specifični enzimi (npr. prokoagulantni i fibrinolitički enzimi);
- plazma-nespecifični enzimi (npr. sekretorni i intracelularni enzimi).

“Ne-funkcionalni” enzimi plazme



Za kliničku hemiju su posebno značajne promene u aktivnosti onih enzima u plazmi koji su intracelularni i normalno prisutni u krvi u niskoj aktivnosti.

Oslobađanje ("curenje") ovakvih enzima u krv ukazuje na oštećenja ćelija (ćelijsku smrt, hipoksiju, unutarćelijsku toksičnost).

Merenjem promena u aktivnosti ovih enzima moguće je utvrditi lokaciju i prirodu patoloških promena na tkivima.

Organo-specifičnost "nefunkcionalnih" enzima nikada nije apsolutna!

Informacije koje se mogu dobiti praćenjem enzimске aktivnosti u krvnoj plazmi:

1. inicijalna dijagnostika;
2. praćenje toka bolesti;
3. praćenje odgovora pacijenta na tretman.

Idealno je pratiti aktivnost enzima koji je visoko tkivno-specifičan (kisela-fosfataza u prostati, ili acetil-holinesteraza u eritrocitima).

Neki enzimi imaju tkivno-specifične izoenzimske forme (laktat-dehidrogenaza) koje je moguće razlikovati elektroforezom.

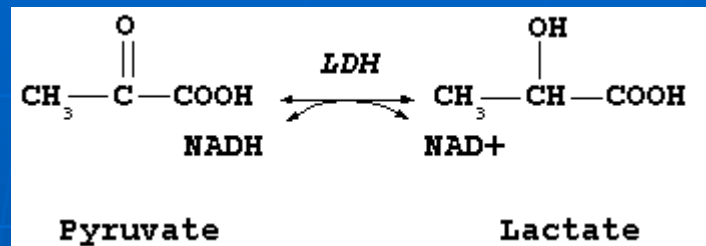
Šta su izoenzimi ?
Šta imaju zajedničko ?
Po čemu se razlikuju ?

Izoenzimi su različite forme istog enzima. Katalizuju isti tip hemijske reakcije. Razlikuju se po strukturi, aktivnosti, K_m , fizičkim svojstvima (npr. otpornost na denaturaciju toplotom), ekspresiji u različitim ćelijama i tkivima (važno za kliničku enzimologiju!!!) i u elektroforetskom profilu.

Enzimi čija se aktivnost u plazmi rutinski određuje

Ime enzima:	Prisutan u:
Aspartate Amino transferase Alanine Amino transferase	Heart and Liver
Serum glutamate-oxaloacetate transaminase Serum glutamate-pyruvate transaminase	Heart and Liver
Alkaline Phosphatase	Bone, intestine and other tissues
Acid Phosphatase	Prostate
γ glutamyl Transferase	Liver
Creatine kinase	Muscle including cardiac muscle
Lactate Dehydrogenase	Heart, liver, muscle, RBC
α Amylase	Pancreas

Laktat dehidrogenaza (LDH)



(anaerobna glikoliza;
Korijev ciklus u jetri)

- Funkcionalni enzim je tetramerni protein izgrađen od dva tipa subjedinica (H=Heart, M=skeletal muscle)
- Postoji u 5 različita izoenzimska oblika (različite kombinacije H i M subjedinica)
- Jako povećana (ukupna) aktivnost LDH u serumu nakon infarkta miokarda. Serumski LDH povećan i kod kancera, meningitisa, encefalitisa, akutnog pankreatitisa i HIV-a.

Određivanje enzimске aktivnosti pri postavljanju kliničke dijagnoze

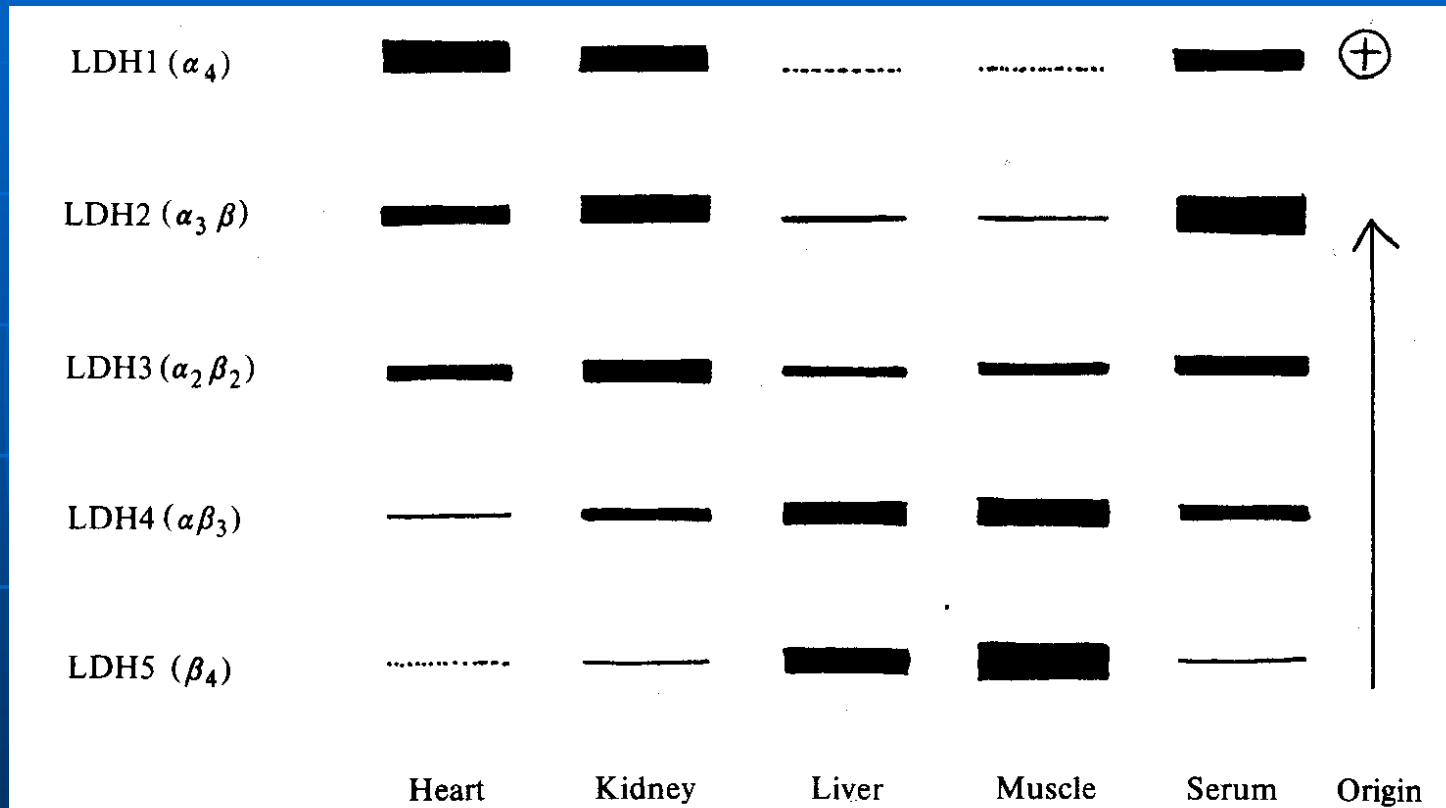


Fig. 10.1. Electrophoretic separation of isoenzymes of lactate dehydrogenase from different tissues.

Methods used to determine the tissue of origin of serum enzymes

Enzyme	Differentiation by electrophoresis	Differentiation by other methods
Lactate dehydrogenase	<p>LDH-1 predominant in heart, erythrocytes, brain and kidney</p> <p>LDH-3 predominant in leucocytes, adrenal and thyroid</p> <p>LDH-5 predominant in skeletal muscle and liver</p>	<p>Differential heat stability, LDH-4 and LDH-5 show greater heat lability.</p> <p>LDH-1 is more sensitive to inhibition by excess pyruvate than LDH-5</p>
Acid phosphatase		<p>Prostate enzyme inhibited by tartrate. Erythrocyte enzyme inhibited by formaldehyde. Differential activities towards substrates, phenyl phosphate and glycerol 2-phosphate and thymolphthalein phosphate</p>
Alkaline phosphatase	<p>Complex electrophoretic patterns. Liver enzyme most cationic</p>	<p>Placental enzyme shows greater heat stability. Enzymes from both placenta and intestine are sensitive to phenylalanine</p>
Creatine kinase	<p>Brain, lung and thyroid mostly CK-1 (or BB). Skeletal muscle almost exclusively CK-3. Cardiac tissue CK-3 + about 15% CK-2</p>	

Klinička enzimologija bolesti jetre

- Alkalna fosfataza (AP) Aspartat aminotransferaza (SGOT), alanin aminotransferaza (SGPT), i γ -glutamilttransferaza (GTT).
- Laktat dehidrogenaza i izocitrat dehidrogenaza.
- Ornitin karbamoilttransferaza.

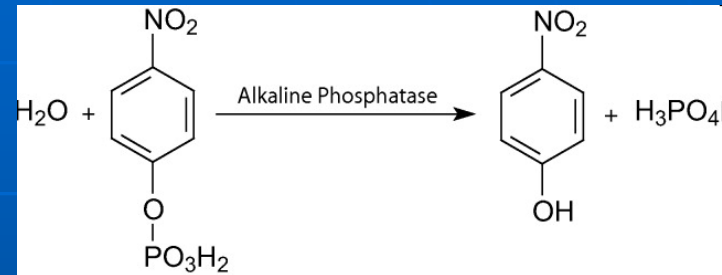
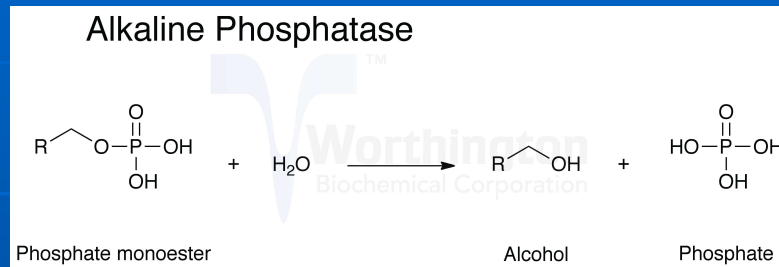
Oboljenja jetre: hepatitis (viralni ili toksični), ciroza, primarni i sekundarni tumori jetre, obstrukcija žučne kese...

/akutna, intermitenta, ili hronična stanja/

- Aktivnost aminotransferaza, tj. odnos SGOT i SGPT
- Alkalne fosfataze su prisutne u jetri i kostima, izoenzimske forme...

Klinička enzimologija bolesti jetre

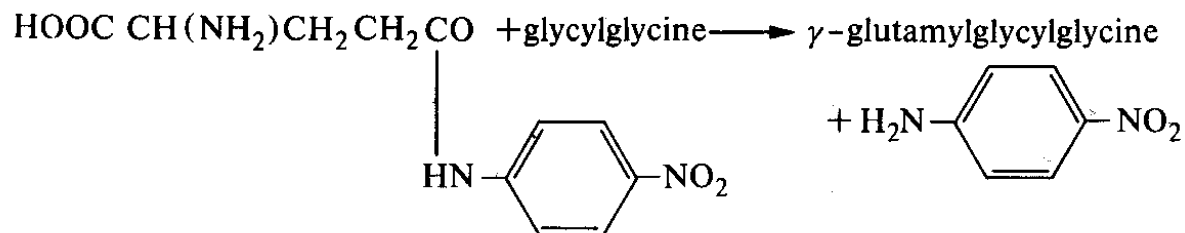
Alkalna fosfataza (AP) katalizuje deforforilaciju različitih molekula.



Aktivnost AP je praćena merenjem hidrolize p-nitrofenil fosfata.

Transferaze: enzimi koji katalizuju transfer neke funkcionalne grupe.

Aktivnost γ -glutamiltransferaze (GTT) je praćena merenjem intenziteta otpuštanja p-nitroanilina, kada se γ -glutamil-p-nitroanilid upotrebljava kao jedan od supstrata. p-nitroanilin apsorbuje na 400 nm.



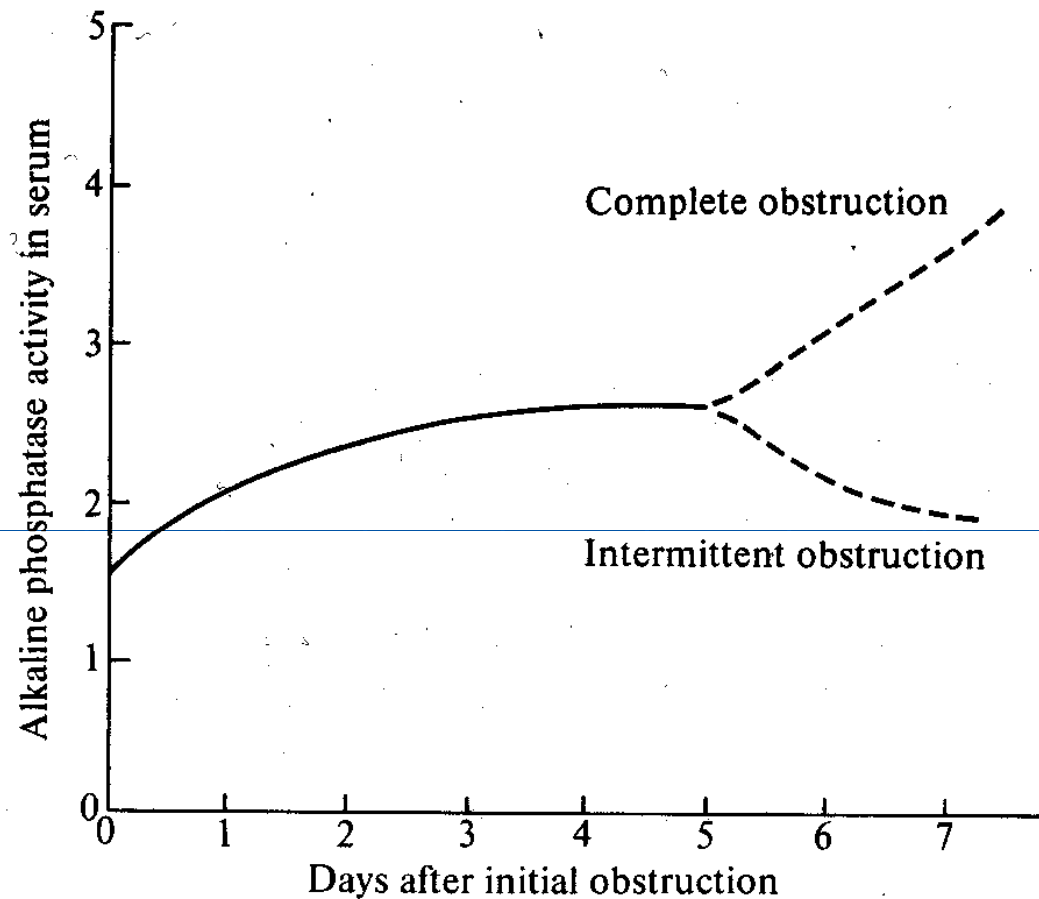


Fig. 10.2. Typical changes in the activity of serum alkaline phosphatase after complete and intermittent obstructive jaundice (see reference 4.)

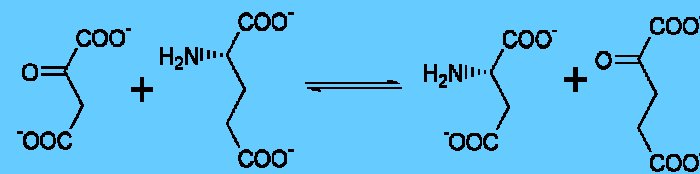
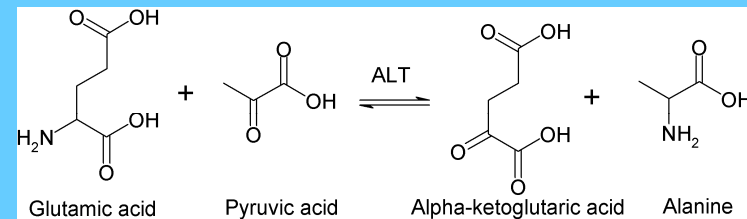
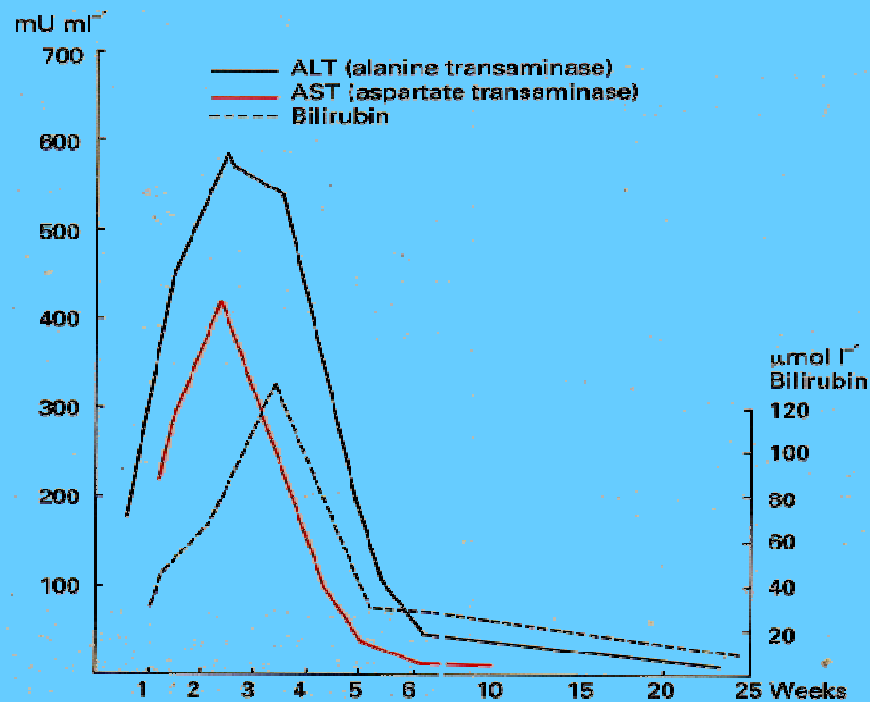
AP/SGPT odnos...

γ -glutamyltransferaza: hronični alkoholizam (ciroza jetre), metastaze...

Merenje transaminaza je korisno za dijagnostiku bolesti jetre

Aminotransferaze (transaminaze) su unutarćelijski enzimi koji katalizuju prenos amino grupe sa aminokiseline na α -ketokiselinu, pri čemu iz ketokiseline nastaje aminokiselina.

Alanin transaminaza (ALT) i **aspartat transaminaza (AST)** su najzastupljeniji u jetri i njihova aktivnost u serumu raste kao rezultat curenja iz oštećenih ćelija.



Virusni hepatitis: veoma brz porast nivoa transaminaza (20-50 puta u odnosu na normalni nivo) u serumu pre porasta nivoa bilirubina.

Kreatin kinaza (CK)



(Fosfokreatin služi kao rezerva energije tokom kontrakcije mišića)

- Kreatin kinaza je dimer, sastavljen od dva monomera
- Skeletni mišići sadrže M, a mozak B (Brain) subjedinicu
- Tri različite izoforme CK mogu da se formiraju
- Povećana aktivnost CK-2 (MB) u akutnom infarktu miokarda

Klinička enzimologija bolesti srca

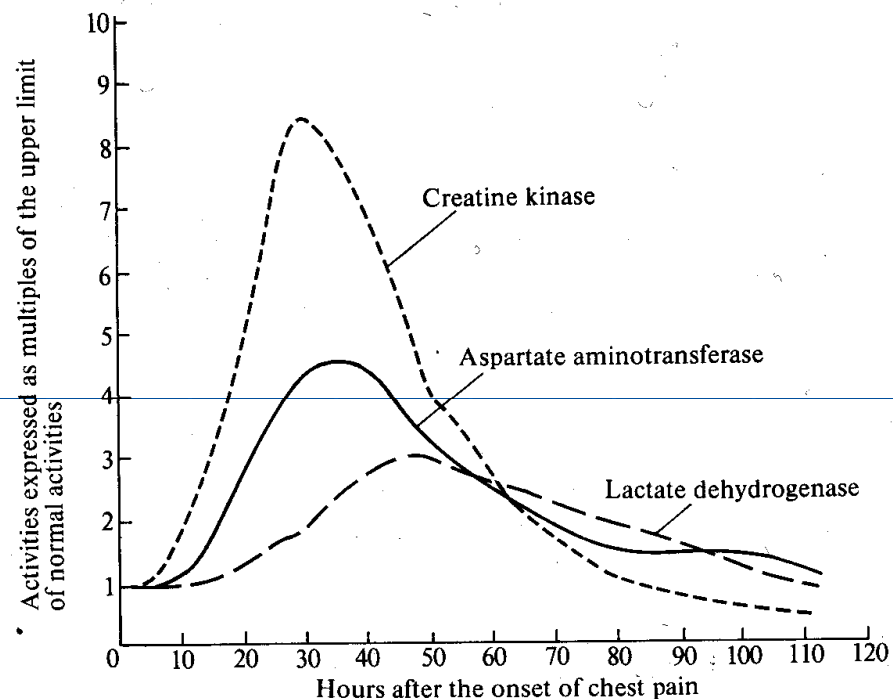


Fig. 10.3. Typical changes in the activities of serum creatine kinase, aspartate aminotransferase (SGOT), and lactate dehydrogenase following myocardial infarction. Activities are expressed as multiples of the upper limit of the normal level (see reference 1).

Kreatin kinaza (izoforme, osim CK-3 (MM tip) iz skeletnih mišića, ima i oko 15 % CK-2 (MB tip) izoforme), SGOT i laktat dehidrogenaza (takodje se prati izoenzimski profil).

SGOT/SGPT u miokardu je 20-25, a u jetri 3-5! Medjutim, CK i GT su precizniji pokazatelji.

α -Amilaza

- Pankreas i pljuvačne žlezde
- Akutni pankreatitis (20-30 puta)
- Hronični pankreatitis ili karcinom pankreaza – malo povišen nivo.
- Zbog niske Mm (49 kD) može se detektovati i u urinu (kao i uropepsinogen).

Kreatin-kinaza i fruktozo-bisfosfat aldolaza

- Oboljenja skeletnih mišića (distrofije), izoenzimski profil CK

Alkalna fosfataza

- Veliki broj izoformi. Nalazi se u velikom broju tkiva: intestinalni epitelijum, bubrezi, kosti, leukociti, jetra i placenta.
- Tri tipa: placentalni (termostabilan), intestinalni i iz drugih tkiva.

Kisela fosfataza

- Nalazi se u velikom broju tkiva: jetra, slezina, eritrociti i prostata.
- Važan za dijagnostiku kancera prostate.
- Veoma je labilan, kontaminacija usled lize eritrocita (inhibicija tartaratom i formaldehidom).
- Prostatični enzim je veoma specifičan za timoftalein fosfat.

Otkrivanje & značaj enzimske deficijencije (nedostatka)

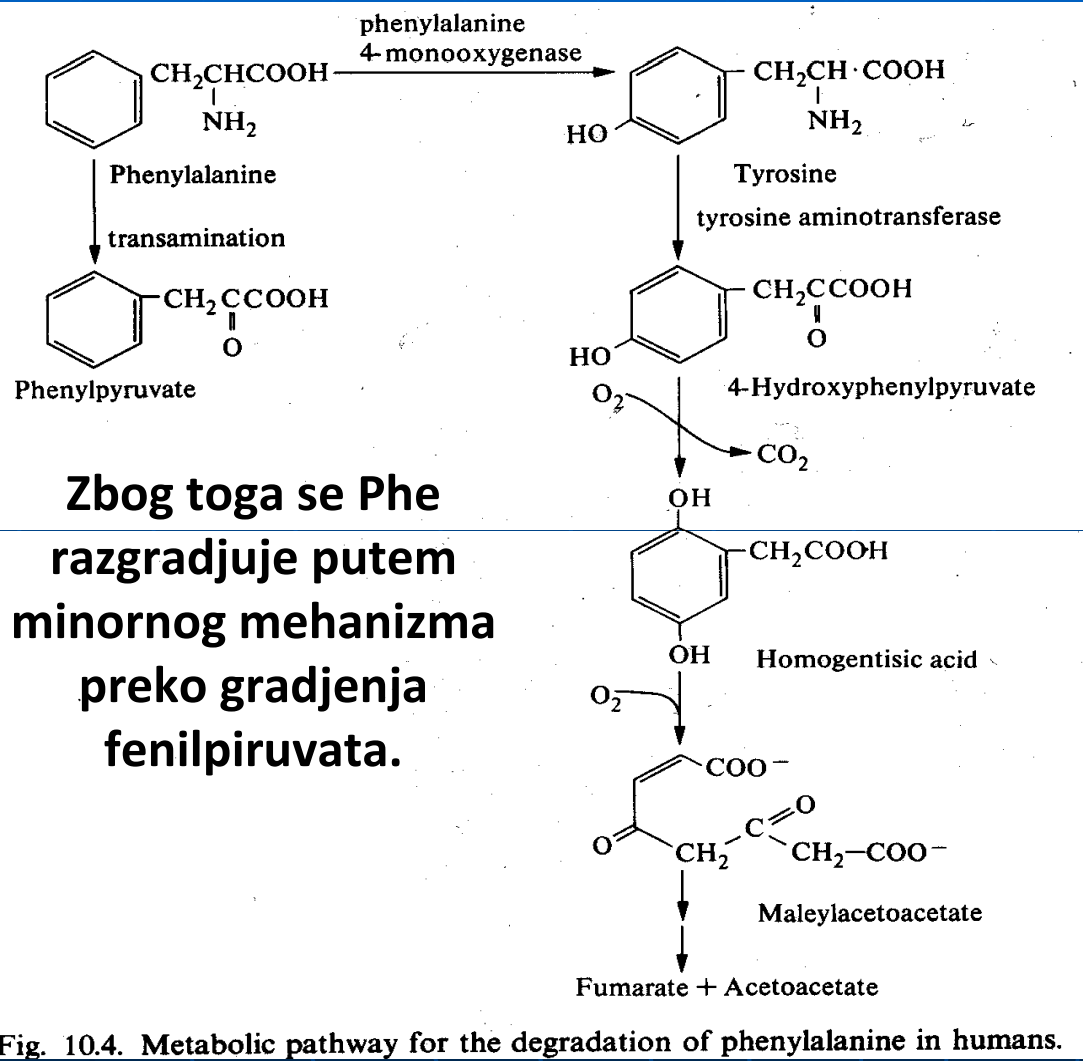
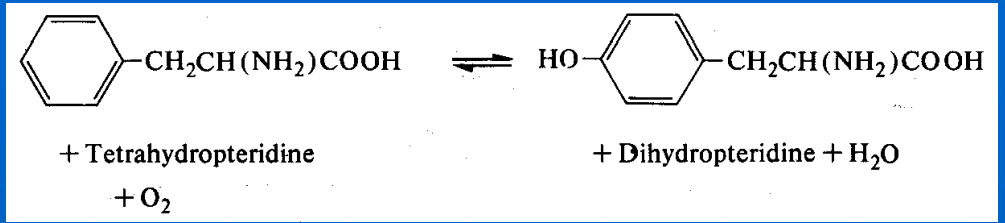
- Za detekciju oboljenja se redje koriste enzimski testovi: detektuju se metaboliti (fenilketourija se detektuje merenjem fenilpiruvata u urinu ili krvi).
- Neke urodjene (genetske) greške u metabolizmu su relativno neškodljive (albinizam, alkaptonurija), ali se druge moraju rano detektovati da bi se štetni efekti defekata sprečili na vreme (npr. fenilketourija i galaktozemija).

Otkrivanje & značaj enzimske deficijencije

Some examples of inborn errors in metabolism due to enzyme deficiencies

Inborn error	Enzyme deficiency
Alcaptonuria	homogentisate 1,2-dioxygenase
Phenylketonuria	phenylalanine 4-monooxygenase
Cystinuria	(renal and intestinal transport defect of cysteine, ornithine and lysine)
Maple syrup disease	branched chain oxy-acid oxidative decarboxylases
Galactosaemia	UDPglucose-hexose-1-phosphate uridylyltransferase
Glycogen storage diseases	glucose-6-phosphatase, α -D-glucosidase, debranching enzyme, liver or muscle phosphorylase
Pentosuria	L-xylulose reductase
Tay-Sachs disease	β -N-acetyl-D-hexosaminidase
Nieman-Pick disease	phospholipase C
Gangliosidosis (generalized)	β -D-galactosidase
Acatlasia	catalase

Kod fenilketonurije nedostaje enzim fenilalanin-4-monooksigenaza koji katalizuje reakciju:



Zbog toga se Phe razgrađuje putem minornog mehanizma preko gradjenja fenilpiruvata.

Akumulacija fenilalanina vodi do moždanih oštećenja i progresivne mentalne retardacije.

Fig. 10.4. Metabolic pathway for the degradation of phenylalanine in humans.

Kod galaktozemije deficitarni enzim je galaktozo-1-fosfat uridiltransferaza.

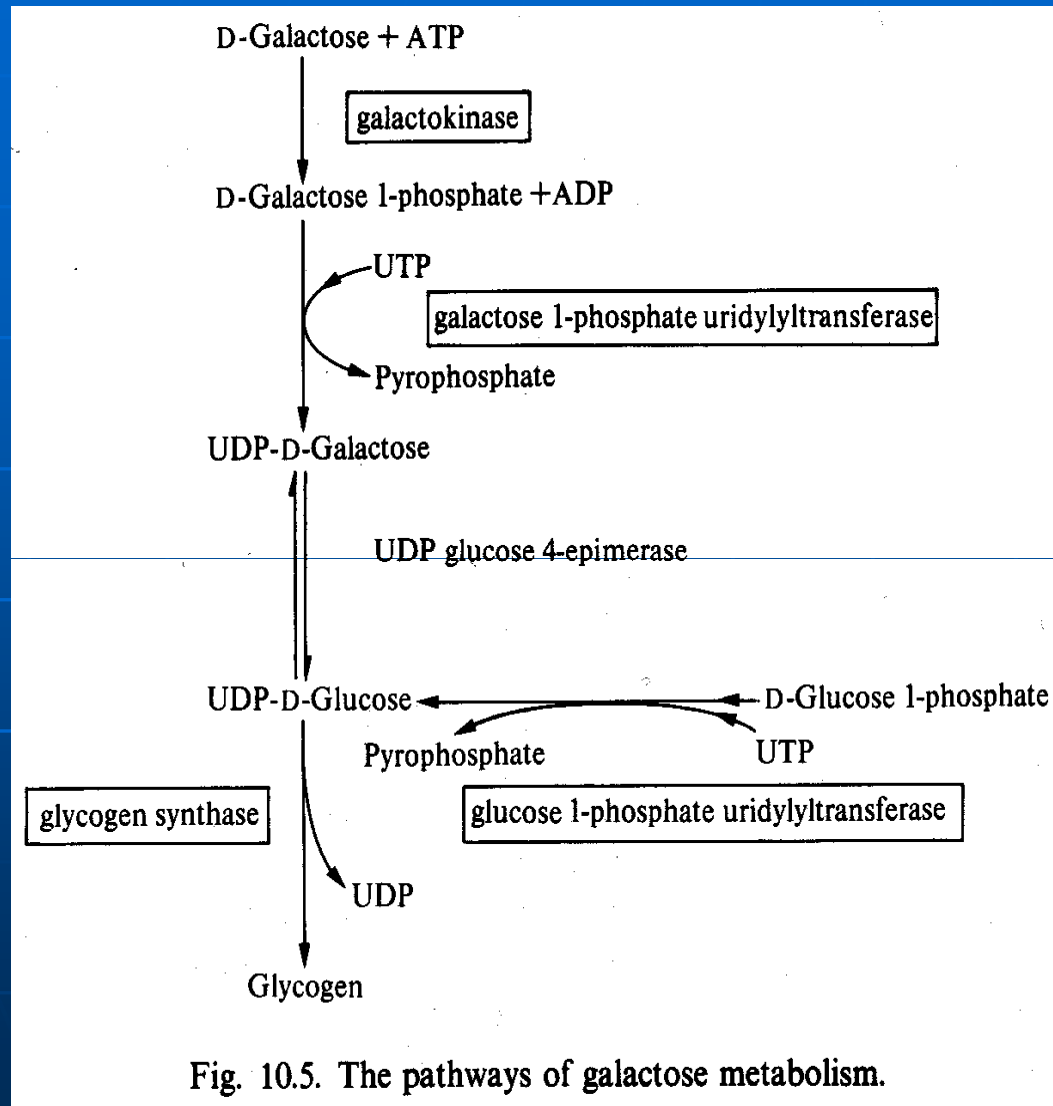


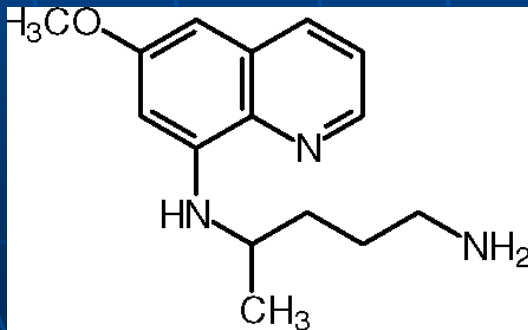
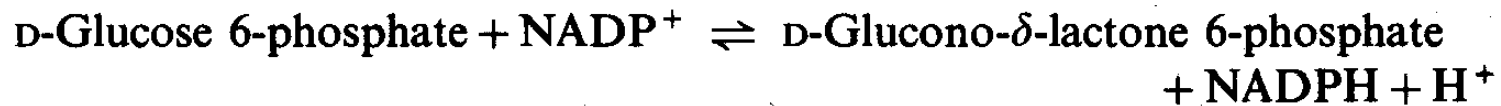
Fig. 10.5. The pathways of galactose metabolism.

Ovaj enzim je prisutan u brojnim tkivima, uključujući eritrocite.

Detektuje se testom na liziranim eritrocitima.

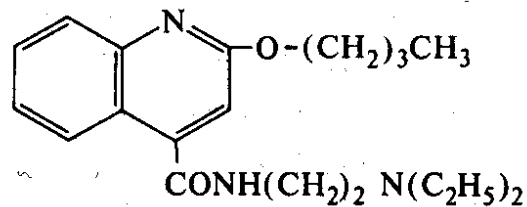
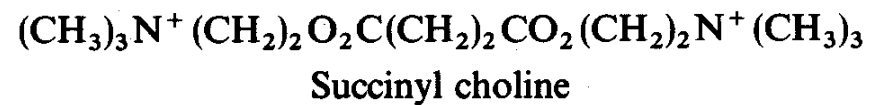
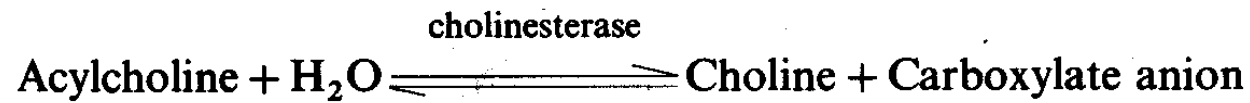
Zbog nedostatka ovog enzima ne može da se iskoristi galaktoza iz mleka, što je ranije dovelo do smrti novorođenčadi.

- Najčešća urodjena bolest koja deluje na eritrocite je deficijencija glukoze-6-fosfat dehidrogenaze. Manifestuje se kao hemolitička anemija indukovana snižavanjem nivoa glutathiona (nakon tretmana lekovima koji inhibiraju ovaj enzim koji je prisutan u veoma malim koncentracijama). Snižava se intracelularna koncentracija NADPH koji je neophodan za redukciju oksidovanog glutathiona.



Primaquine (antimalarik)

- Drugi primer osetljivosti na lekove koja je povezana sa urodjenom deficijencijom je u slučaju serum holinesteraze (pseudoholinesteraza).
- Sukcinil holin (mišićni relaksant) u slučaju deficijencije pseudo-holinesteraze se ne razgrađuje normalno i daleko duže deluje nego kod normalnih subjekata.
- Ovaj enzim kod deficijentnih osoba ima daleko višu Km za sve testirane supstrate nego normalna forma ovog enzima.



Dibucaine

Local anesthetic

Upotreba enzima za određivanja koncentracije metabolita od kliničkog značaja

Metabolit se enzimski transformiše u proizvod čija koncentracija se određuje spektrofotometrijski. Visoka specifičnost enzima omogućava određivanje metabolita u prisustvu brojnih drugih supstanci u urinu ili serumu.

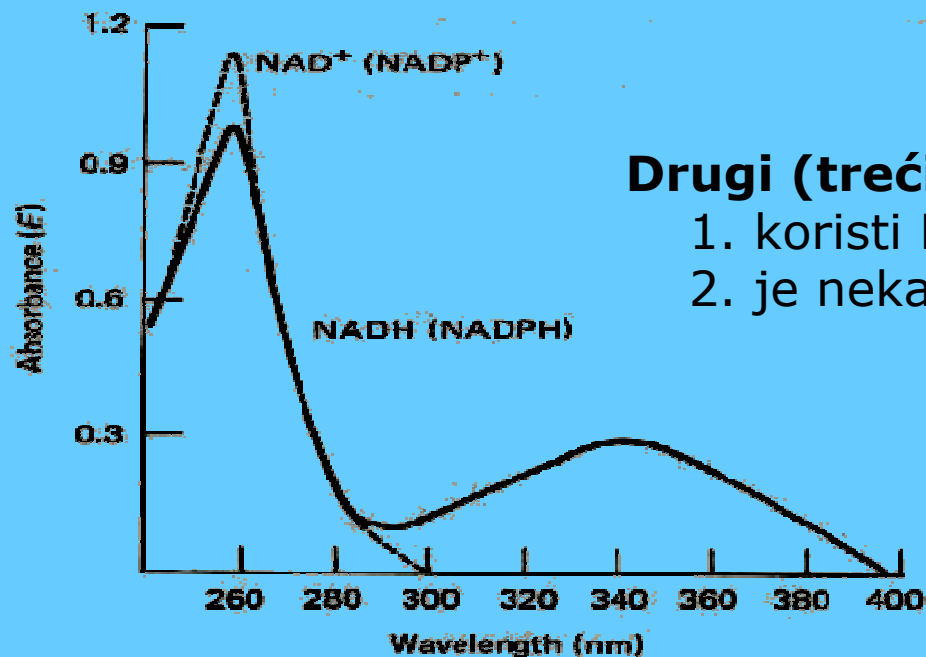
Kuplovane reakcije omogućavaju pomeranje ravnoteže na desno, tj. u povoljnom smeru. Takodje, moguće je i hemijski ukloniti proizvod enzimske reakcije.

$$K = \frac{[\text{fructose 6-phosphate}]}{[\text{glucose 6-phosphate}]} = 0.3,$$

1. D-Fructose 6-phosphate \rightleftharpoons D-Glucose 6-phosphate.
2. D-Glucose 6-phosphate + NADP⁺ \rightleftharpoons D-Glucono- δ -lactone 6-phosphate + NADPH + H⁺.
3. D-Glucono- δ -lactone 6-phosphate + H₂O \rightleftharpoons 6-Phospho-D-gluconate.

Merenje enzimske aktivnosti: kuplovani eseji

- Prisustvo inhibitora i aktivatora utiče na merenje aktivnosti enzima od interesa. Stoga se njihova aktivnost određuje tzv. kuplovanim esejima, gde se drugi enzim koristi da deluje na proizvod enzimom katalizovane reakcije od primarnog interesa.

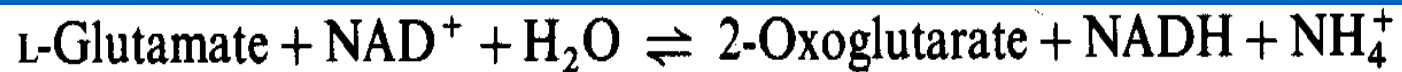


Drugi (treći u nizu) enzim obično:

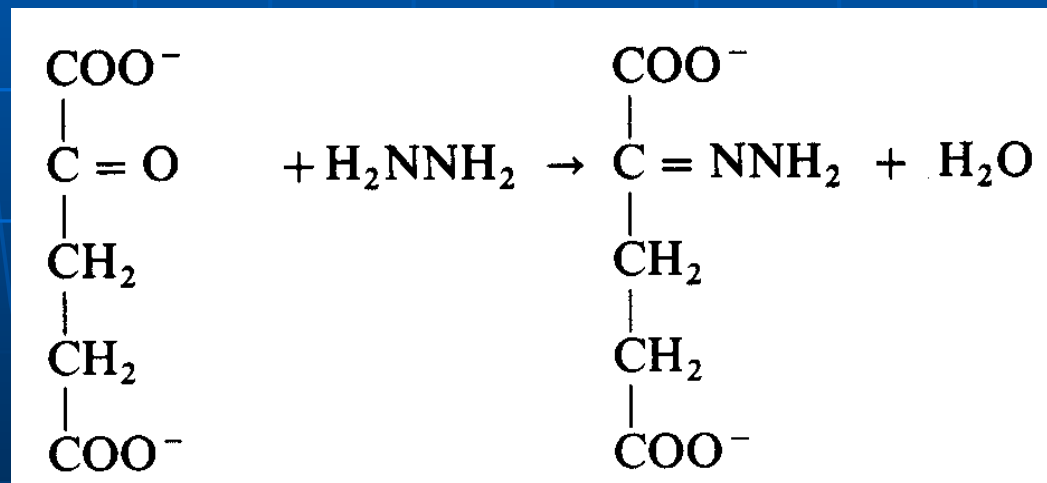
1. koristi NADH kao koenzim;
2. je neka peroksidaza.

Figure 6.5 Ultraviolet absorption spectra of NADH and NAD⁺

Upotreba enzima radi određivanja koncentracije metabolita od kliničkog značaja

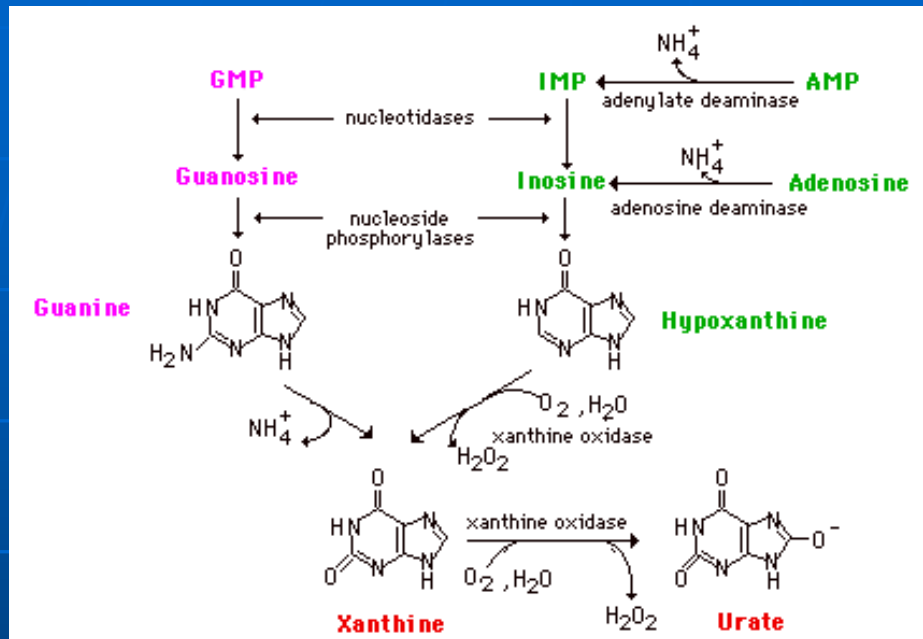


2-oksoglutarat ili 2-ketoglutarat (ključni intermedijer u Krebsovom ciklusu!!!) reaguje sa hidrazinom:



α -Ketoglutarat se prodaje kao dijetetski suplement za bodibildere.

Mokraćna kiselina

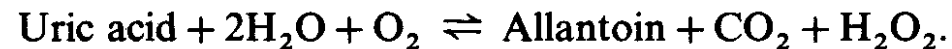


Mokraćna kiselina se stvara kao produkt katabolizma purinskih nukleotida.

Chemical

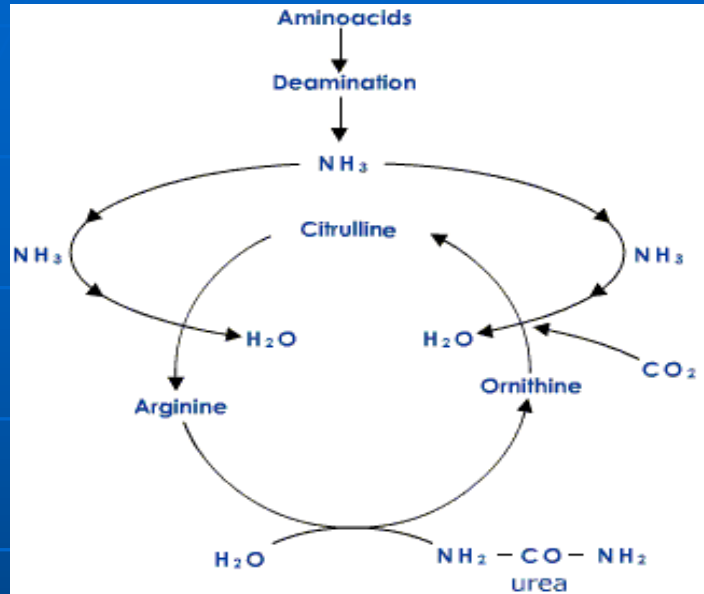


Enzymatic



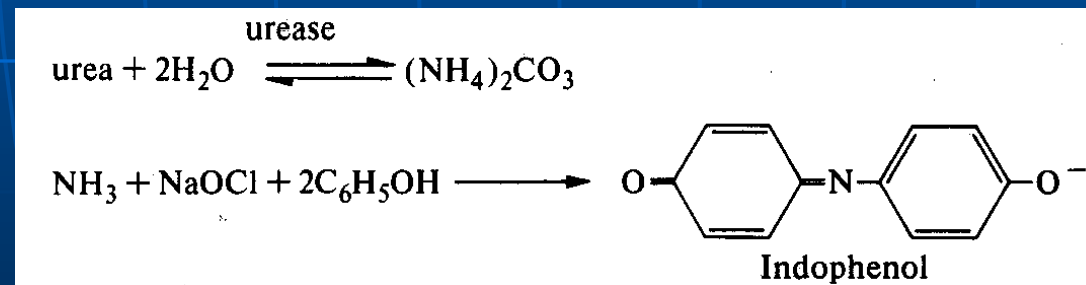
Visoka koncentracija mokraćne kiseline u krvi može dovesti do gihta (jedan tip artritisa).

Urea (karbamid)



Urea ima esencijanu ulogu u metabolizmu jedinjenja koja sadrže azot u kod životinja... krajnji proizvod metabolizma proteina.

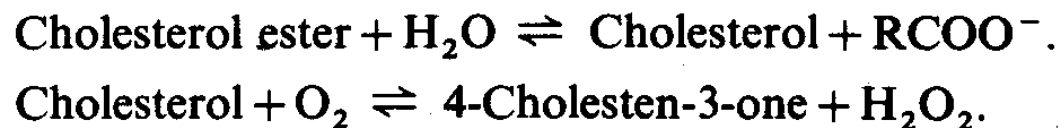
BUN – blood urea nitrogen!



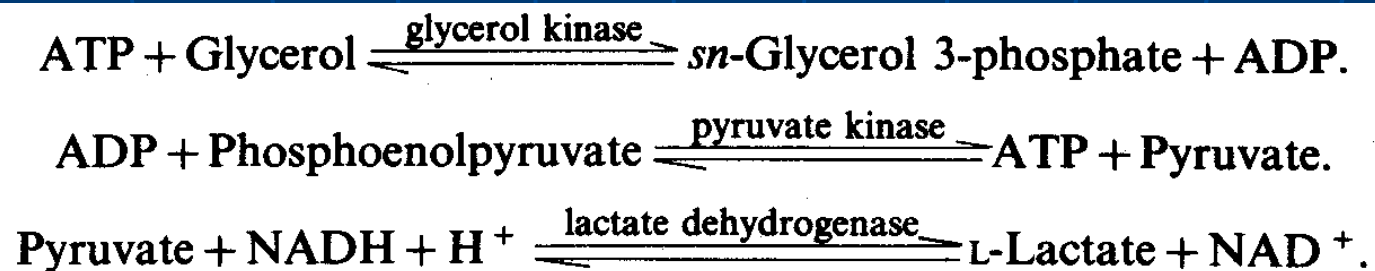
Povišena koncentracija uree u serumu je kod bolesnika koji imaju smanjenu funkcionalnu sposobnost bubrega i kojih je povećana razgradnja proteina (groznica, nekroza) u organizmu.

Holesterol & trigliceridi

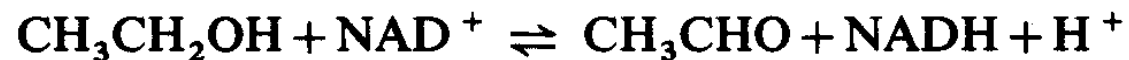
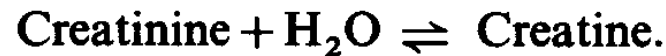
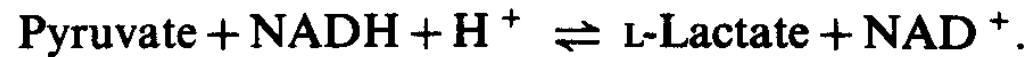
Povećan sadržaj holesterola u cirkulacije je primarni faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (ateroskleroza). Najveći deo holesterola u serumu (u sastavu lipoproteina) je esterifikovan.



Merenje nivoa serumskih triglicerida u plazmi i serumu je korisno pri praćenju toka dijabetesa, nefroza i obstrukcije žuči. Merenje se može vršiti i enzimski, obično nakon alkalne hidrolize triglicerida, preko određivanja oslobođenog glicerola.



Ostali metaboliti...



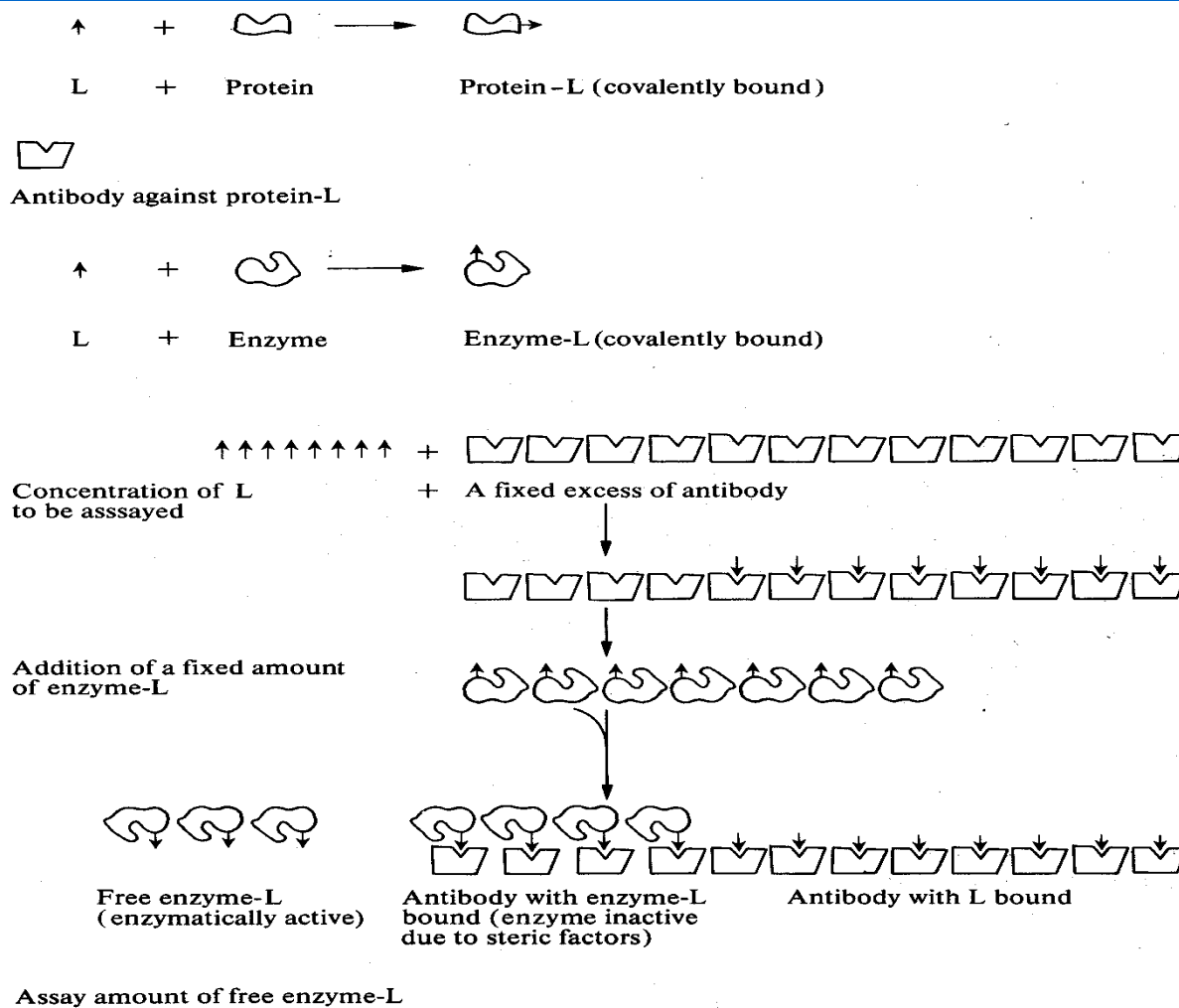


Fig. 10.6. The method of enzyme immunoassay. The diagram illustrates how this method is used to assay compound L after forming a covalent derivative of compound L with a purified enzyme.

http://www.youtube.com/watch?v=70TPrfL_8-M&feature=relmfu

<http://www.youtube.com/watch?v=RRbuz3VQ100&feature=relmfu>