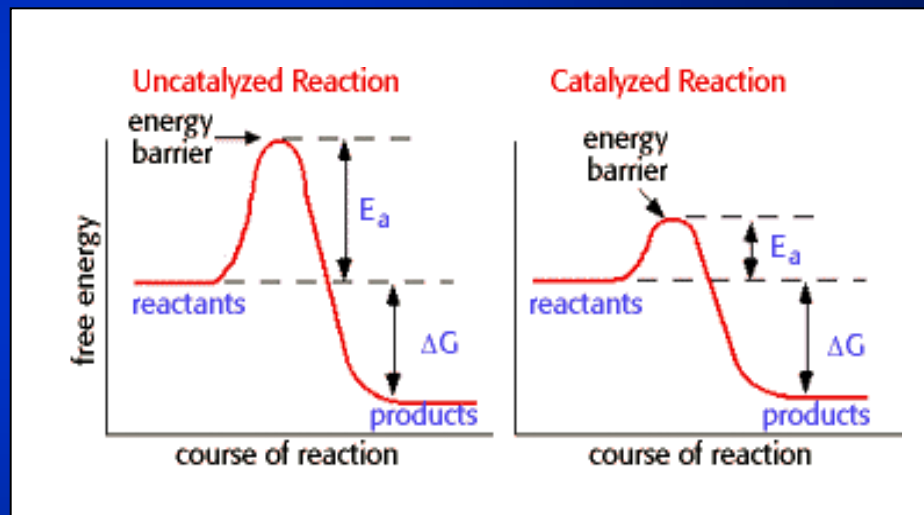


## Az enzimek

A kémiai reakciók mindig a szabadenergia csökkenés irányába mennek végbe.

Miért nem alakul át minden anyag a számára legalacsonyabb energiájú, legstabilabb állapotába?



Válasz: aktivációs energiagát

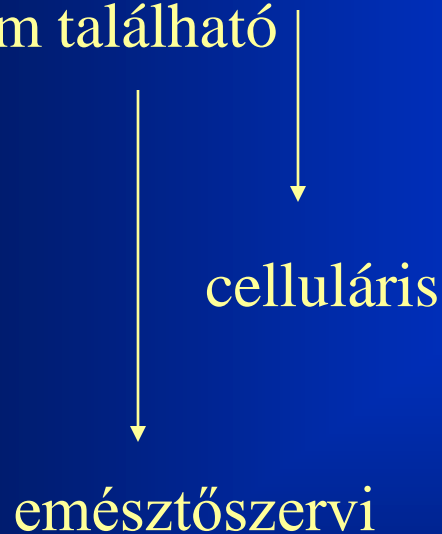
Az enzimek ezt az aktivációs energiagátat csökkentik.

# Enzimdiagnosztika

A rutin klinikai kémiai eljárások 1/3-a

12000-13000 ismert enzim → ebből 15-20 enzimet szokás mérni

Normális élettani körülmények között a testfolyadékokban kevés enzim található



Csak kóros körülmények között jelennek meg

**Jelentőség:** saját enzimaktivitás révén határozható meg

- szerv
- szövet
- sejt-kompartimentum specifikus fehérje

**A meghatározásnál fontos gyakorlati szempontok**

- az enzimek a sejtből kijutva denaturálódhatnak
- időben lineáris-e?
- arányos-e a sejtpusztulással?

**Izoenzimek**

**Enzim izoformák**

**Az izoenzimek diagnosztikai jelentősége óriási**

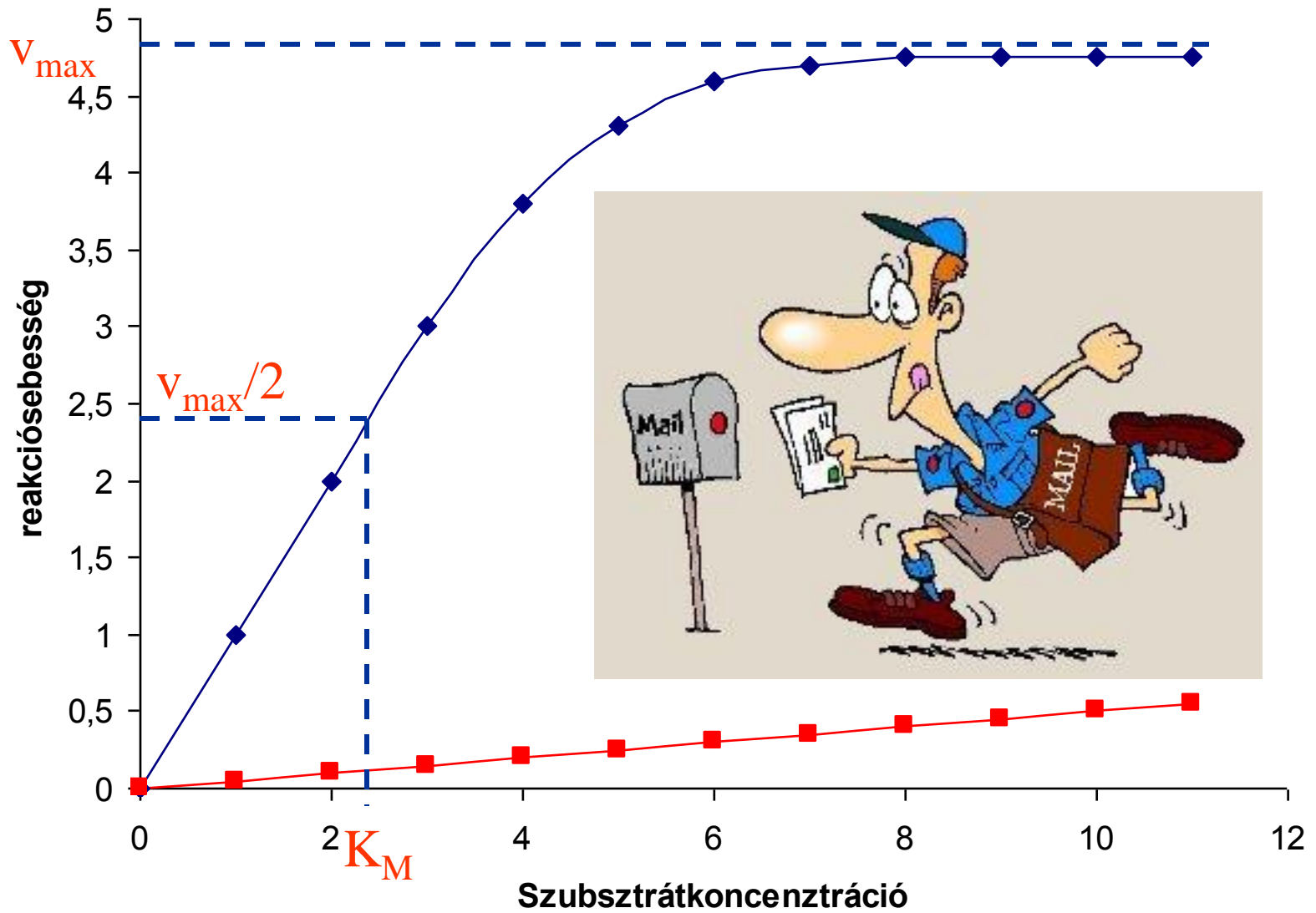
Leggyakrabban végzett izoenzim vizsgálat: **CK-MB, CK-MM**

Szelektív mérése a CK-MM aktív centrumához kapcsolódó monoklonális antitesttel lehet

## **Enzimaktivitás mérése optimális körülmények között**

- optimális szubsztrátum koncentráció**
- optimális pH**
- optimális ionkoncentráció**
- optimális koenzimkoncentráció (ha szükséges)**
- standard hőmérséklet**

# „A postásnak is csak két keze van.”



# A Michaelis-Menten modell



Maud Menten

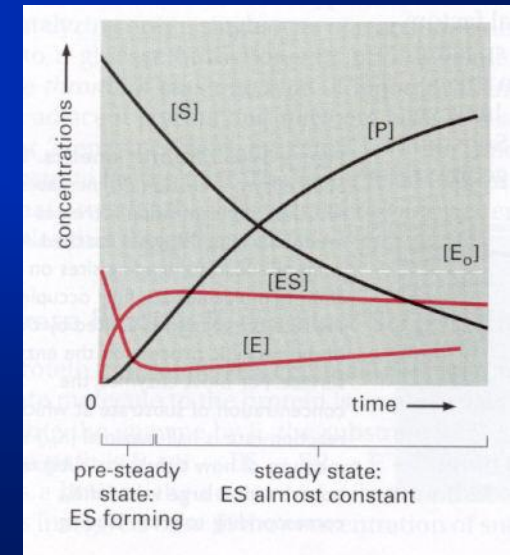


Leonor Michaelis



## Kiindulási feltételek, egyszerűsítések:

1. Az első lépés gyors ekvilibrium
2. A második lépés irreverzibilis
3. Kezdeti sebességet vizsgálunk
4.  $E \ll [S]$



ES fogyasztás = ES képződés

$$k_{-1}[ES] + k_2[ES] = k_1 [E][S]$$

$$[E] = [E_0] - [ES]$$

$$[ES] = [E][S] * k_1 / (k_{-1} + k_2) = ([E_0] - [ES])[S] * k_1 / (k_{-1} + k_2)$$

$$K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

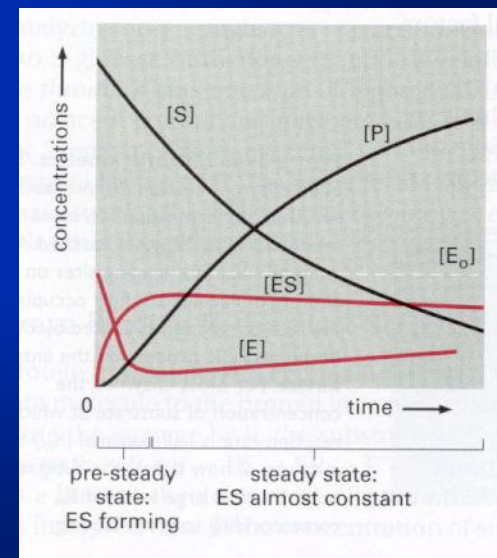
$$[ES] = ([E_0] - [ES])[S] * 1 / K_m$$

$$[ES] K_m + [ES] [S] = [E_0] [S]$$

$$[ES] = [E_0] [S] / (K_m + [S])$$

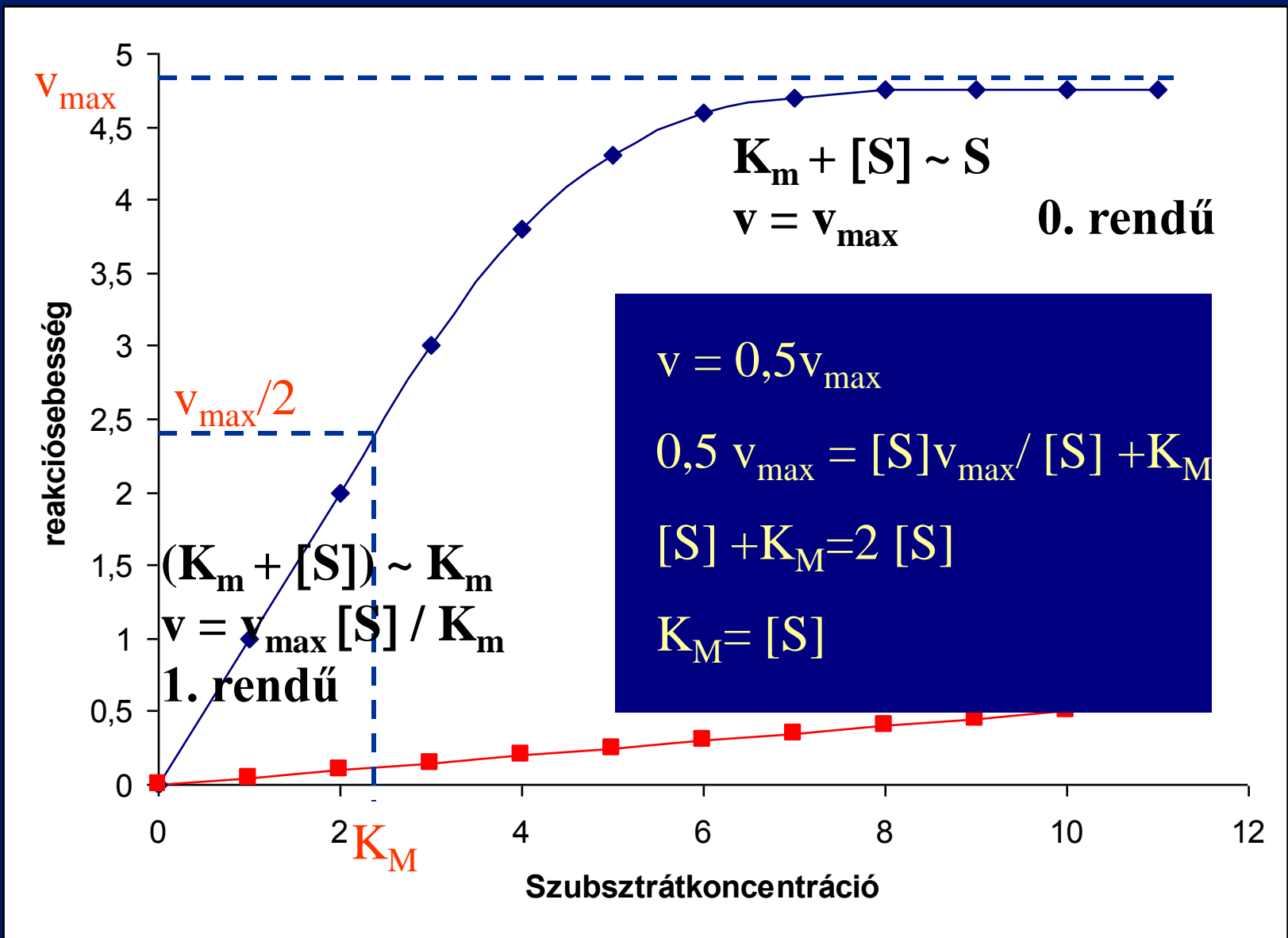
$$v = k_2 [E_0] [S] / (K_m + [S])$$

$$v = v_{\max} [S] / (K_m + [S])$$





$$v = v_{\max} [S] / (K_m + [S])$$



Akkor lineáris az enzimreakció, ha 0. rendű szakaszban mérünk.



Ha nem lineáris, akkor a mért enzimaktivitás nem arányos a fehérje mennyiségével

### **Hogyan tudjuk ezt biztosítani:**

- Kellően magas szubsztrátkoncentráció (fél, egy nagyságrenddel a  $K_M$  érték felett)
- a reakciótermék mennyisége még észrevehetően ne befolyásolja a reakciósebességet

**pH optimum:** *in vitro* érvényes pH optimumot jelent

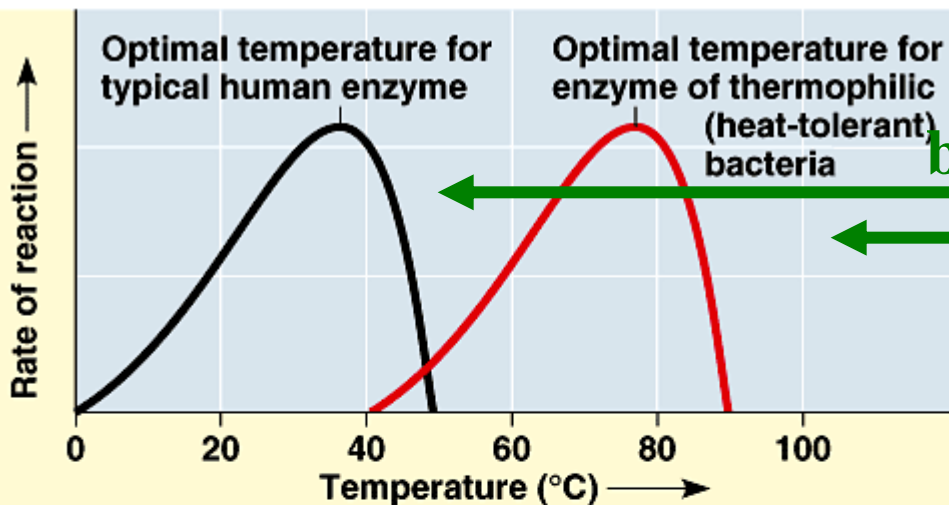
Pl.: alkalikus foszfatázoknál pH=10

**Optimális ionösszetétel:** pH állandó értéken tartása miatt pufferelni kell. Léteznek természetes pufferek (ezeket is magasabb koncentrációban alkalmazzák)

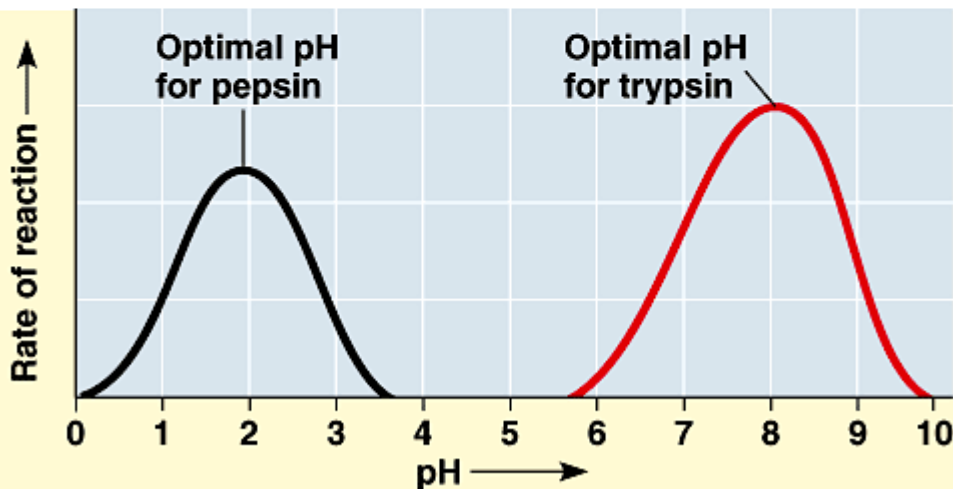
Biztosítani kell az aktivitáshoz szükséges ionok jelenlétét

**Optimális koenzimkoncentráció:** Mindig az adott reakció esetén kell megtalálni az optimumot

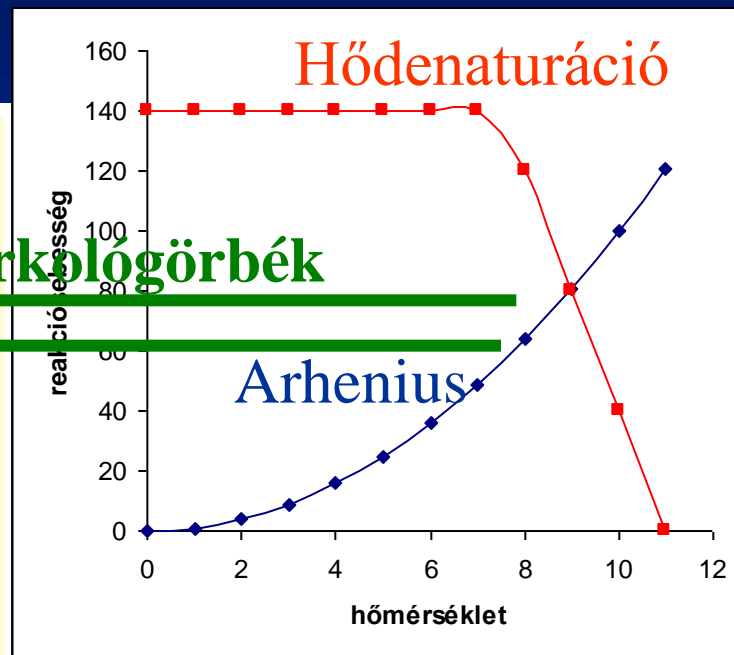
# A pH és a hőmérséklet hatása az enzimreakciók sebességére



(a) Optimal temperature for two enzymes



(b) Optimal pH for two enzymes



# Optimális hőmérséklet

**Kezdetben 25°C-ra állították az összes enzimreakciót**

~ kétszer lassabb reakció, mint testhőmérsékleten



-időautomatika nélküli fotométereknél előny (3x1 perc)

- alacsonyabb koenzimkoncentráció

- alacsonyabb szubsztrátkoncentráció

**Hátrány:** lassúság

Napjainkban 37°C-ra állítják az automatákat



gyorsabb —————> Így gyorsulnak a mérések többségét  
kitevő szubsztrátmeghatározások



Egyszerűbb kivitelezni csak egyféle  
hőmérsékleten kell mérni

Ez a legmagasabb még denaturáció mentes mérési hőmérséklet.

Az automaták ma már előre programozhatóak és 10-15-20 sec-os  
mérési időközökkel rendelkeznek.

Reakcióidő: A legrövidebb idő, amely alatt a normális felső határának megfelelő enzimaktivitások még jól mérhetőek.

-Lineáris

- abszorbanciaváltozás hibahatáron belül megadható

Régen: 3x1 perc, ma jóval rövidebb, pl.: 10-15-20 sec

# Kreatin-kináz

Dimer szerkezetű: kb. 82 kDa

A monomerek nem rendelkeznek enzimaktivitással

3 altípus:

1. Izom (M)
2. Agy (B)
3. Mitokondriális (Mi)

M és B szabadon alkothatnak párokat, mindegyik aktív



Vérplazma: döntő része MM típusú, vázizom eredetű

CK-BB: idegrendszeri, nincs igazán diagnosztikus ereje

**Kiemelt szerep: CK-MB**

A szívizomra jellemző: szívinfarktus jellegzetes markere az elzáródást követő 3., 4. órától kezdve (azt megelőzően szintje alacsony)

## Meghatározása



$$\lambda = 340 \text{ nm}$$

Fontos: az enzim aktivitásához SH csoportját redukáltan kell tartani (a reagens redukált tiolvegyületet tartalmaz)

## A CK-MB szelektív meghatározása



**CK-M alegység aktív centruma elleni monoklonális antitesttel**



**Aktivitás: CK-MB**

**CK-BB**

**A CK aktivitás 95%-a a CK-MM-től származik**



**Izomsérülés esetén igen magas is lehet**

**Szívinfarktus klinikai tüneteinek jelentkezését követően 8-24 óra között az össz-CK mérése igen fontos**



**Kétszeres referenciaérték infarktus mellett szól (300 U/l felett)**



**Kétséges eredmény esetén kötelező a CK-MB izoenzim meghatározás**

# $\gamma$ -kolinészteráz

Szerep: kolinerg szinapszisokban acetilkolin hidrolízise



gyors lecsengés

Máj pszeudokolin-észteráz

Szérum kolinészteráz

} Az extracelluláris tér fiziológiás  
összetevői, élettani szerepük nem ismert

Gyakori örökletes hiánya nem jár együtt klinikai jelekkel



Nagy szükség nem lehet rá

# Alkalikus foszfatáz

pH optimum 10 körül

Minden sejtben megtalálható

Élettani szerep: csak sejthető, szénhidrát, aminosav transzportfolyamatban

Három izoenzim:

- intestinalis
- placentáris
- nem specifikus (csont, máj, vese granulocytá)

Önmagában nem értékelhető

Normálisan emelkedett szintje fokozott csontépiles esetén

Értékelés gond nélkül: már diagnosztizált esetekben

- cholestasis

- Paget-kó nyomon követés

Egyes esetekben elkerülhetetlen az izoenzimek meghatározása

Jelentőség: Narkotikumok mellett szukcinil-kolint alkalmaznak izomrelaxánsként

Ezt az  $\gamma$ -kolinészteráz bontja el

Enzim hiányában, vagy alacsony szintje esetén az izomrelaxáns hatása elhúzódik

légzőizmok bénulását okozhatja



# ASAT, ALAT

ASAT: aszpartát-aminotranszferáz

ALAT: alanin-aminotranszferáz

## Lokalizációjuk

ASAT: mitokondrium, citoszól

ALAT: citoszól

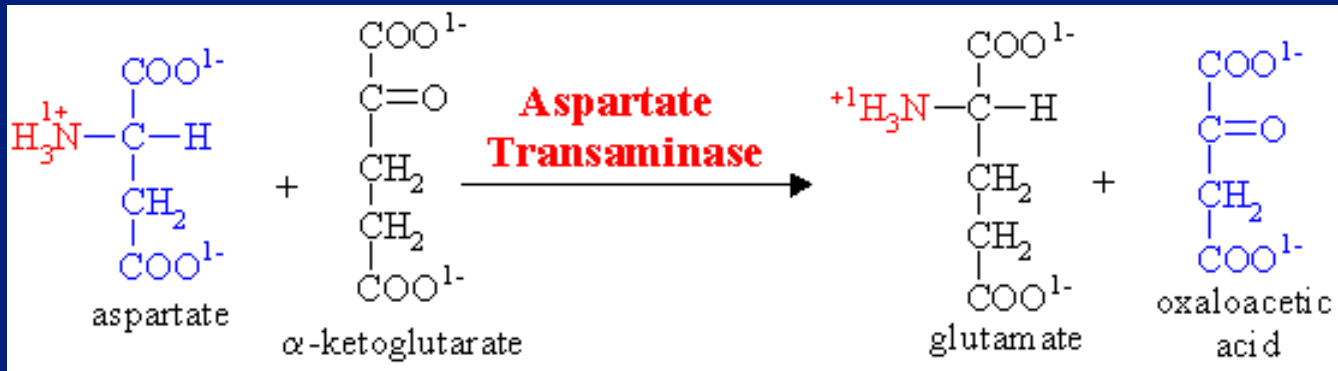
**ASAT/ALAT arány** fontos diagnosztikai paraméter

- $>1$  májsejt szétesés
- $<1$  permeabilitás fokozódás

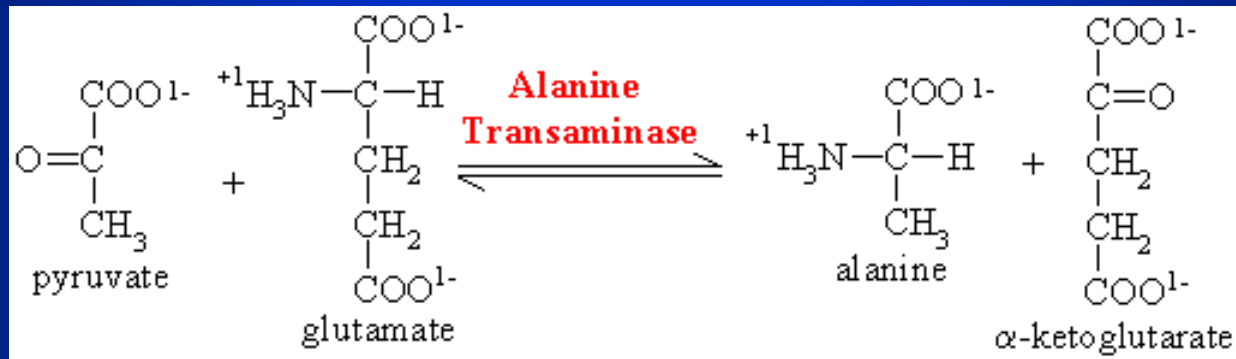


Ilyenkor a mitokondriális ASAT nem szabadul fel

# ASAT



# ALAT



**Meghatározás: a ketosavak redukciójával**



$\lambda = 340 \text{ nm}$

# Laktát dehidrogenáz, LDH



$$\lambda = 340 \text{ nm}$$

5 izoenzim

140 kDa

4 db 35 kDa alegység (2 különféle)

Szív (H) }  
Izom (M) } 5 féle tetramer képződik belőle

A vvt tele van LDH-val, hemolizált mintából nem lehet meghatározni

Minden szövetsérülés esetén emelkedik az LDH (szívinfarktus, májsejt szétesés, hemolítikus anémia stb.)

Különösen magas mononucleosis infectiosaban