

# ***ENZIMI OD KLINIČKOG ZNAČAJA***

---

## Dijagnostički značaj enzimske analize

- **Detekcija enzimske deficijencije u ćeliji**
  - Urođene greške metabolizma
  - Stečene deficijencije
    - Kod deficijencije vitamina
    - Kod trovanja (trovanje organofosfatnim jedinjenjima holinesteraza)
- **Detekcija oštećenja tkiva merenjem ekstracelularnih enzima u raznim telesnim tečnostima**
  - Serum, plazma, urin, likvor itd

**Enzimi su plazmatski markeri oštećenog tkiva**

## Ciljevi određivanja enzimske aktivnosti u plazmi

1. Utvrditi oštećenje tkiva
2. Identifikovati organ iz koga potiče oštećenje
3. Utvrditi koliki je opseg oštećenja u tkivu
4. Dijagnostikovati osnovne bolesti
5. Uspoređivati aktivnosti enzima
6. Utvrditi prisutnost izoenzima

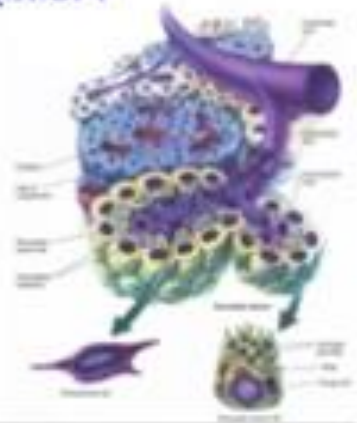
# 1. Sekretorni enzimi

## A. Inkretorni enzimi ili enzimi unutrašnjeg lučenja

- Sintetišu se na endoplazmatičnom retikulumu hepatocita i izlučuju u krv gde ostvaruju svoju funkciju
  - Faktori koagulacije
  - Holinesteraza
  - Ceruloplazmin
  - Lipoproteinska lipaza

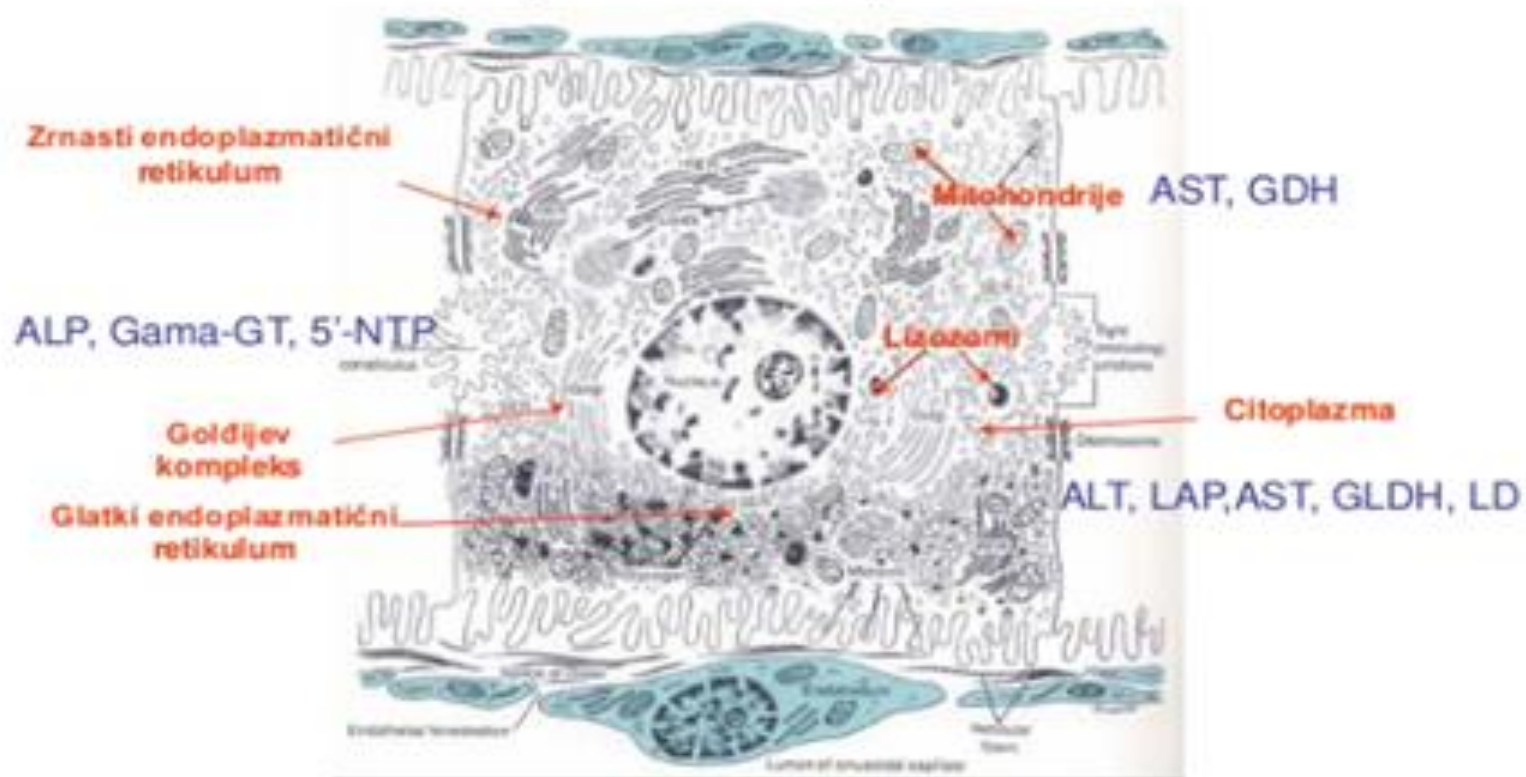
## B. Ekskretorni enzimi

- Sintetišu se u fundusu želuca, acinusnom delu pankreasa i sluznici creva
  - Pepsinogen
  - Amilaza
  - Tripsinogen
  - Himotripsinogen
  - Karboksipeptidaza



## 2. Intracelularni enzimi

### Lokalizacija enzima u hepatocitima

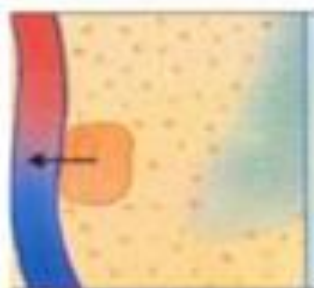


## Efluks enzima iz oštećenih ćelija u cirkulaciju

- Kada se jednom uspostave uslovi za izlazak enzima iz oštećenih ćelija brzina i količina enzima koja prelazi u cirkulaciju zavisi od više faktora:
- Koncentracioni gradijent
- Difuzija
  - Brže izlaze male molekule
- *Prelaz enzima iz eritrocita i endotelnih ćelija u krv*  
Vrlo brz
- *Prelaz iz intersticijalnog prostora u cirkulaciju:*
  1. **Direktan kroz zidove kapilara**  
velika permeabilnost kapilara  
jetra, delimično i u srcu
  2. **Putem limfne drenaže**  
manja permeabilnost kapilara  
GIT, pankreas, srce

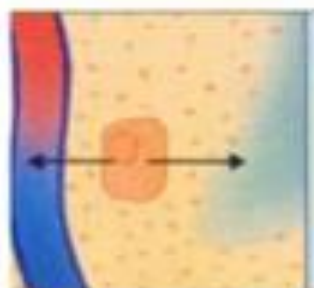
## Efluks enzima iz oštećenih ćelija u cirkulaciju

### Putevi ulaska enzima u cirkulaciju



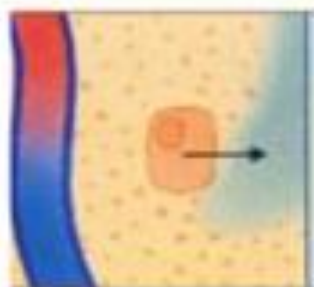
Vrlo permeabilna  
Bazalna membrana  
Ćelije blizu kapilara

Direktno u krv



Semi-permeabilna  
Bazalna membrana  
Ćelije dalje od kapilara

Delimično ili potpuno  
putem limfe



Nepermeabilna  
Bazalna membrana  
Ćelije daleko od kapilara

Putem limfe obavezno  
Limfna drenaža

## Efluks enzima iz oštećenih ćelija u cirkulaciju

- **Uticaj intracelularne lokacije enzima na efluks enzima**
- **Oslobađanje membranskih enzima**
  - Disocijacija ili degradacija
- **Oslobađanje enzima vezanih za organele**
  - Mitohondrijalni enzimi
  - Teže oslobađanje
  - Ireverzibilno razgradnja ćelije

### *Primeri*

1. Infarkta miokarda

Nekroza tkiva

24 sata posle IM enzimski profil u cirkulaciji odražava profil u tkivu miokarda

2. Hronične bolesti jetre

Uticao sinteze enzima i brzine uklanjanja iz cirkulacije

GGT - ektoenzim



# Eliminacija enzima iz cirkulacije

Klirens enzima putem:

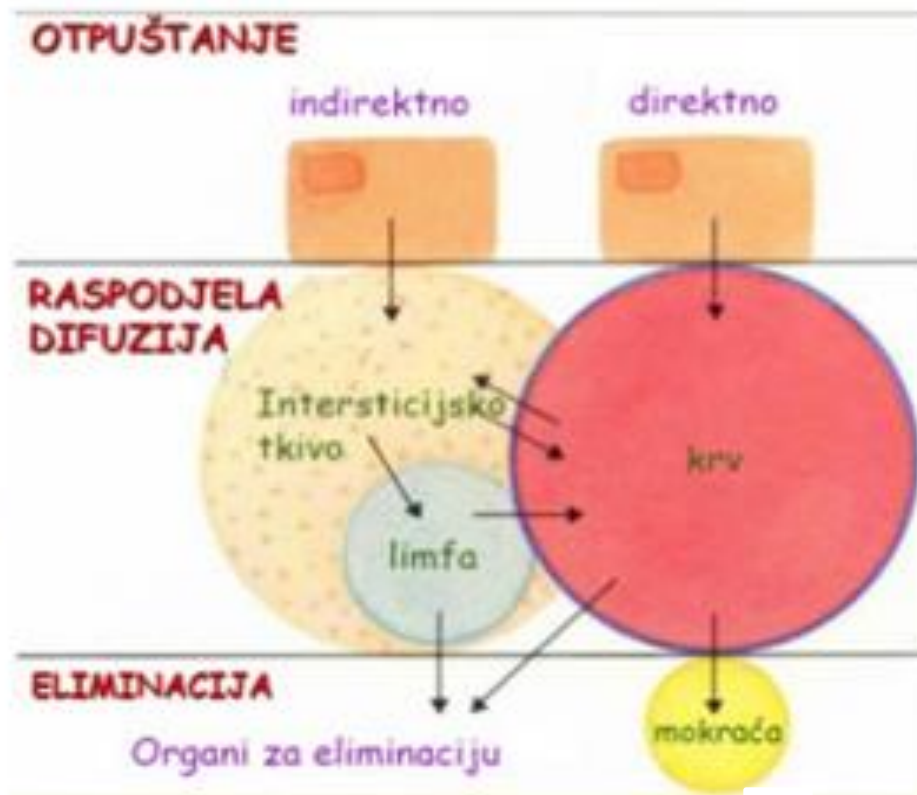
1. Urina (amilaza)

2. RES

kostna srž, slezina i jetra

(Kupferove ćelije)

CK, AK, mAST i cAST, MD



## Molekularna masa dijagnostički važnih enzima, kDa

• Lipaza	48 000
• Amilaza	50 000
• Kreatin kinaza (CK)	80 000
• Aspartat-aminotransferaza (AST)	90 000
• Alanin-aminotransferaza (ALT)	180 000
• Kisela fosfataza (ACP)	100 000
• Laktat-dehidrogenaza (LD)	140 000
• Alkalna-fosfataza (ALP)	140 000
• $\gamma$ -Glutamil transferaza (GGT)	300 000

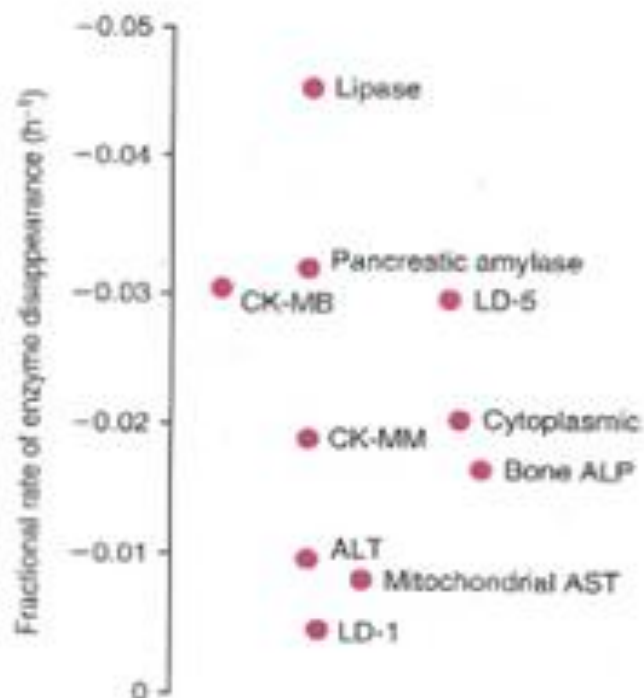
## Poluživot enzima



- Poluživot enzima varira:
- Od nekoliko sata do nekoliko dana
- Prosečno  $t_{1/2}$  od 6 do 48 sati

$$K_d = 2,303 \log \frac{2}{t_{1/2}} = \frac{0,693}{t_{1/2}}$$

Frakciona brzina uklanjanja (u satima)  
za najvažnije enzime u serumu



# Biološki poluživot enzima u plazmi

LD1

LD5

CK

AST

ALT

ALP

GGT

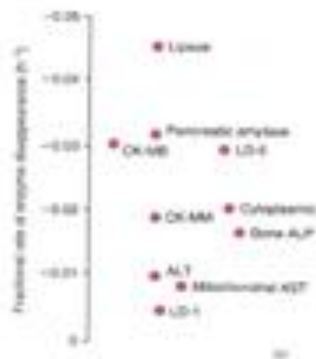
## Poluživot enzima



- Poluživot enzima varira:
- Od nekoliko sati do nekoliko dana
- Prosečno 17,2 od 6 do 48 sati

$$k_d = 2,303 \log \frac{2}{t_{1/2}} = \frac{0,693}{t_{1/2}}$$

Frakcijska brzina uklanjanja (u satima)  
za najvažnije enzime u serumu



3-7 sati

3-7 sati

# 1. Određivanje organo specifičnih enzima

## Enzimi kao tkivni markeri

	Serum	Eritrociti	Jetra	Srce	Mišić
<b>AST</b>	1	x15	x7000	x8000	x5000
<b>ALT</b>	1	x7	x3000	x400	x300
<b>LD</b>	1	x300	x1500	x1000	x700
<b>CK</b>	1	<1	<10	x10000	x50000

Osetljivost

Specifičnost

**Enzimski profil**

### 3. Enzimski profili

Određivanje nekoliko enzima (enzimski profil) i posmatranje relativne enzimске aktivnosti, izračunavanje određenih koeficijenata

#### Mišića i srca

CK

AST

LDH

ALD

GP

#### Jetre

ALT

AST

ALP

GGT

5NT

CHE

AST/ALT

#### Pankreasa

Amilaza

Lipaza

Tripsin

Himotripsin

Elastaza-1

#### Kosti

ALP

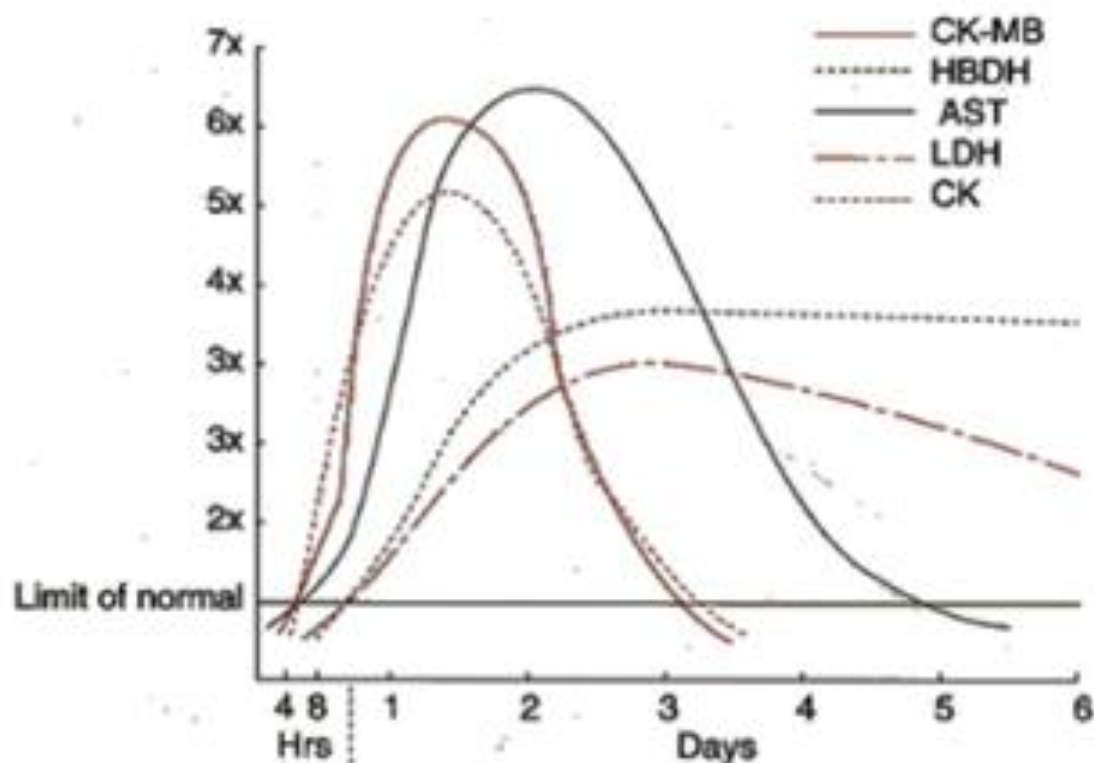
AcP

## 4. Praćenje enzimske aktivnosti u toku određenih vremenskih intervala

Dinamika promena enzima u akutnom infarktu miokarda

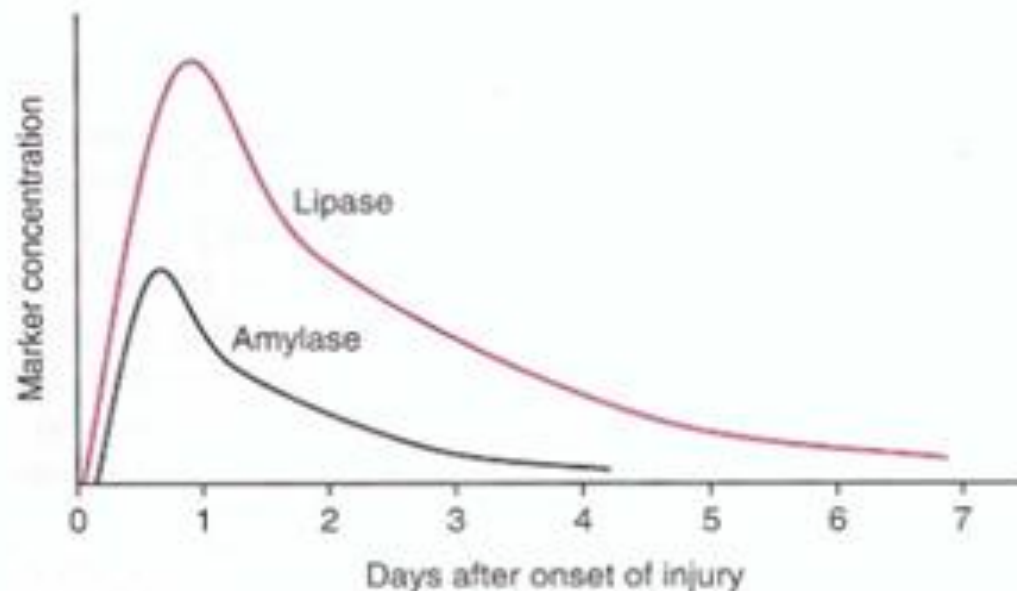
Dijagnostički prozor enzima

Rani i kasni markeri



#### 4. Praćenje enzimske aktivnosti u toku određenih vremenskih intervala

Dinamika promena enzima u akutnom pankreatitisu



Dinamika promena lipaze i amilaze nakon akutnog pankreatitisa

1. Veće vrednosti lipaze 3x URL
2. Duže ostaju povišene vrednosti u serumu



# AMINOTRANSFERAZE

# Aminotransferaze

- Uloga
- Mehanizam reakcije transaminacije
- Distribucija u ćeliji i organima
- Klinički značaj
- Analitika
- Preanalitički uticaji
- Referentne vrednosti

# Aminotransferaze ili transaminaze

- Aminotransferaze predstavljaju grupu enzima koji katalizuju interkonverziju aminokiselina u 2-oksokiseline transferom amino grupe

## Aspartat aminotransferaza AST (ASAT)

- Stari naziv: glutamat oksalacetat transaminaza
- Skraćenica GOT ili SGOT (serumska GOT)
- Enzimski broj: EC 2.6.1.1;
- L-aspartat: 2-oksoglutarat aminotransferaza; AST

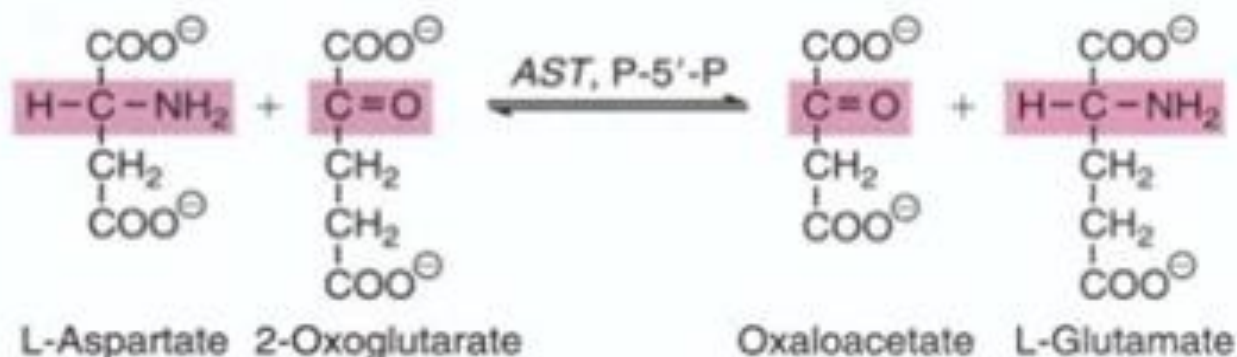
## Alanin aminotransferaza, ALT (ALAT)

- Stari naziv: glutamat piruvat transaminaza
- Skraćenica GPT ili SGPT (serumska GPT)
- Enzimski broj: EC 2.6.1.2;
- L-alanin: 2-oksoglutarat aminotransferaza; ALT

# Aminotransferaze

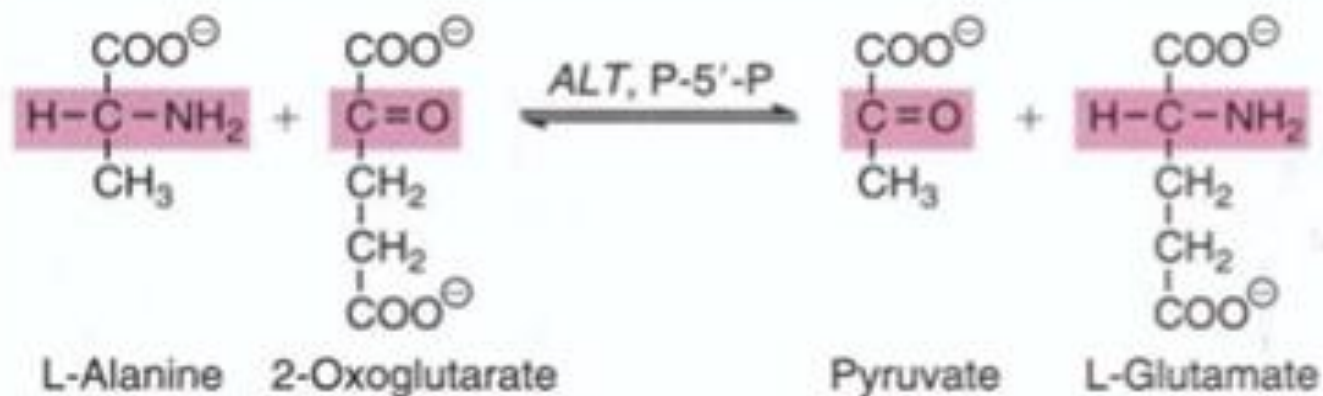
- Par 2-oksoglutarat/L-glutamat ili 2-ketoglutarat/L-glutamat služi kao akceptor amino grupe i kao donor u svim reakcijama transfera aminogrupe
- Specifičnost pojedinačnog enzima proističe iz specifične aminokiseline koja služi kao donor amino grupe

AST katalizuje sledeću reakciju



# Aminotransferaze

ALT katalizuje sledeću reakciju



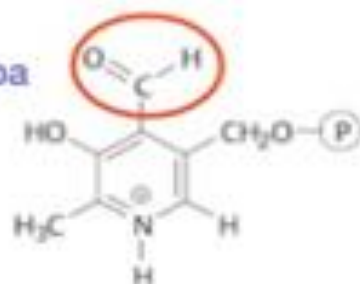
Reverzibilne reakcije

Ravnoteža je više pomerenka stvaranju aspartata i alanina

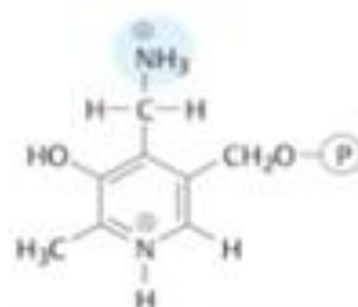
# Aminotransferaze

- Piridoksal-5'-fosfat (P-5'-P) i njegov amino analog piridoksamin-5'-fosfat funkcionišu kao **prostetične grupe** u reakciji transfera amino-grupe.
- P-5'-P je vezan za apoenzim i služi kao prava prostetična grupa
- P-5'-P vezan za apoenzim prihvata amino grupu od prvog supstrata, aspartata ili alanina i gradi kompleks enzim-vezan piridoksamin-5'-fosfat i prvi reakcioni produkt oksalacetat ili piruvat.
- Koenzim u amino formi zatim vrši transfer njegove amino grupe na sekundarni supstrat, 2-oksoglutarat, pri čemu gradi sekundarni produkt, glutamat, a P-5'-P se regeneriše.

Reaktivna grupa  
aldehidna



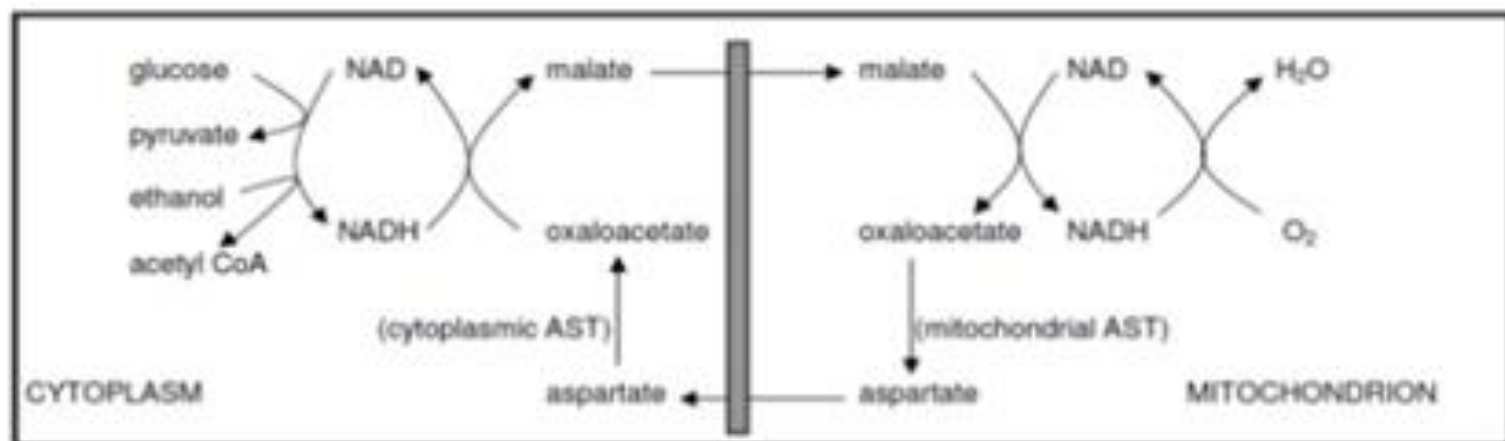
Piridoksal-5'-fosfat



Piridoksamin-5'-fosfat

## Uloga aminotransferaza u metabolizmu

- ALT učestvuje u katabolizmu aminokiselina
  - Veza sa glukoneogenezom
- AST u prenošenju redukcionih ekvivalenata u mitohondrije
  - Malatni šatl sistem



# Distribucija aminotransferaze

## Distribucija u organima

- Aminotransferaze su široko rasprostranjene u organizmu
- AST se primarno nalazi u srcu, jetri, skeletnim mišićima
- AST je manje prisutna u bubrezima, mozgu, plućima, eritrocitima
- ALT je pre svega zastupljena u jetri (najviše) i bubrezima, sa mnogo manjim količinama u srcu i skeletnim mišićima

## Ćelijska lokalizacija:

- ALT je prevashodno citoplazmatični enzim
- AST postoji kao mitohondrijalna m-AST i citoplazmatična forma c-AST

## Struktura izoenzima AST

- Ovo su genetski dva različita izoenzima sa dimernom strukturom
- Dva identična polipeptidna lanca sa po 400 AK.



## Aktivnosti aminotransferaza u humanim tkivima u odnosu na serum

	AST	ALT
Srce	7800	450
Jetra	7100	2850
Skeletni mišić	5000	300
Bubrezi	4500	1200
Pankreas	1400	130
Slezina	700	80
Pluća	500	45
Eritrociti	15	7
Serum	1	1

## Klinički značaj transaminaza



ALT – bolesti jetre

AST – bolesti jetre, skeletnih mišića, srčanog mišića

AST/ALT De Ritisov koeficijent (AAR)

**Hepatogram:** AST, ALT, ALP, GGT, bilirubin, ukupni proteini i albumin

### Bolesti jetre

- Jetreni enzimi u diferencijalnoj dijagnostici 2 najvažnija tipa oboljenja jetre:
  - Hepatocelularna oštećenja iolestaza
- Transaminaze služe za detekciju inflamacije i oštećenja nekroze hepatocita
- Za dijagnozu i prognozu bolesti jetre
- **Bolesti jetre su najvažniji uzrok povećane aktivnosti transaminaza u serumu**
- U najvećem broju bolesti jetre, aktivnost ALT je veća od AST, izuzev u alkoholnom hepatitisu, hepatičnoj cirozi i neoplazmi jetre

# Klinički značaj transaminaza

## Virusni hepatitis

- U virusnom hepatitisu i drugim formama jetrenih bolesti vezanih za akutnu hepatičnu nekrozu, serumske ALT i AST koncentracije su povećane i pre kliničkih simptoma i pojave simptoma žutice

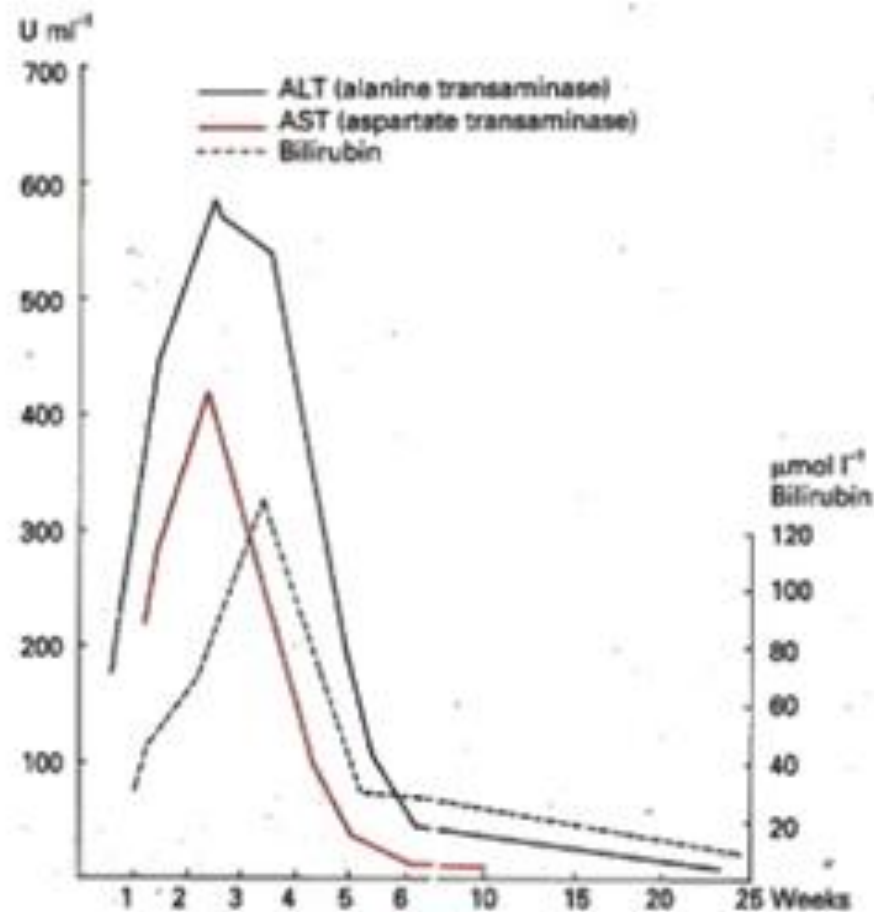
### Dinamika enzimskih promena aktivnosti

- Aktivnosti oba enzima mogu dostići vrednosti i do 100 puta veće od URL
- Najčešće vrednosti su povećane 10-40 puta
- Za vrednosti do 7 puta >URL najveća dijagnostička senzitivnost i specifičnost
- Pik vrednosti nisu vezane za prognozu i mogu opadati i pored pogoršanja stanja pacijenta

# Nivoi enzima u oboljenjima jetre

## Akutni virusni hepatitis

### Dinamika enzimskih promena



- Brz porast transaminaza ALT i AST u serumu
- Veći porast ALT
- Brži porast u odnosu na bilirubin
- Pik vrednosti aktivnosti transaminaza se javljaju između 7. i 12. dana
- Aktivnosti se posle gradualno smanjuju
- Dostižu normalne vrednosti posle 3 do 5 nedelje oporavka

## Klinički značaj transaminaza

### Hronični hepatitis

- Perzistentno povećane vrednosti ALT duže od 6 meseci nakon akutnog hepatitisa služe za dijagnozu hroničnog hepatitisa
- Većina pacijenata sa hroničnim hepatitisom imaju maksimum ALT manji od 7 x od URL
- ALT može biti stalno normalan u oko 15 do 50 % slučajeva pacijenata sa hroničnim hepatitisom C
- Kod pacijenata sa akutnim hepatitisom C, ALT se mora meriti periodično u toku naredne 1 do 2 godine

### Toksični hepatitis

- Slika u toksičnom hepatitisu je različita od one u infektivnom hepatitisu
- Kod hepaticnog oštećenja acetaminofenomom, pik transaminaza je više od 85 puta od URL u 90 % slučajeva, a to su vrednosti koje se retko sreću kod akutnog virusnog hepatitisa.
- Vrednosti ALT i AST tipično dostižu pik vrlo rano i brzo opadaju.

## Klinički značaj transaminaza

### Akutni alkoholizam

### Alkoholni hepatitis

- Povećane vrednosti transaminaza
- $AST > ALT$
- Uzrok porasta transaminaza
  - Oštećenje mitohondrija i porast mAST
  - ALT osetljiviji na deficijenciju piridoksal fosfata
  - Nutritivna deficijencija
  - Deficijencija B6 - koenzim transaminaza
  
- Odnos  $AST : ALT > 2$

## Klinički značaj transaminaza

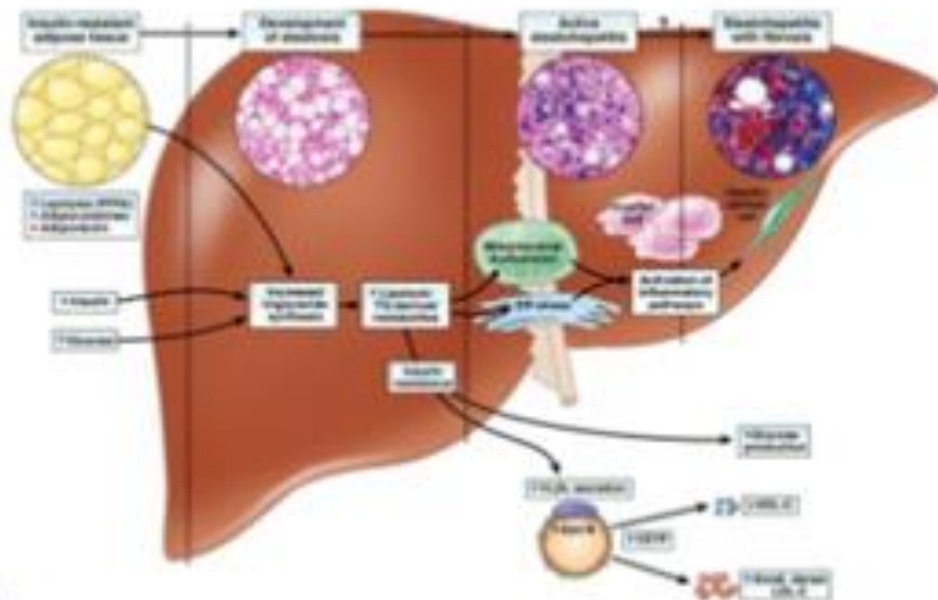
### Nealkoholna masna jetra

### NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease)

- NAFLD – pojava masne jetre najčešće dolazi do povećanja aminotransferaza ukoliko nije virusni i alkoholni hepatitis
- Uzroci bolesti nealkoholne masne jetre:
  1. Gojaznost
  2. Insulinska rezistencija
  3. Metabolički sindrom

# Gojaznost i nealkoholna masna jetra

Jetra ima određen kapacitet sinteze VLDL  
Višak TG masna jetra



Učestalost:  
gojazne odrasle osobe: 50-75%  
gojazna deca: 25-50%

Nealkoholna masna jetra steatoza → steatohepatitisa → fibroze → ciroze → kancera

Nealkoholna masna jetra je hepatična manifestacija insulinske rezistencije.



## Klinički značaj transaminaza

### Ciroza jetre

- Dobijene vrednosti transaminaza kod ciroze jetre variraju zavisno od statusa procesa ciroze
- Vrednosti se kreću od 4 do 5 puta više od URL
- Odnos AST/ALT veći od 1
  - reflektuje stepen fibroze kod ovih pacijenata
- Ovaj slučaj znači da je redukcija u produkciji ALT u oštećenoj jetri

# Klinički značaj transaminaza

## Hepatotoksično dejstvo lekova

- Blaga ili srednja povećanja oba enzima i ALT i AST su dobijena kod davanja raznih medikamenata
  - Nesteroidni antiinflamatori lekovi, antibiotici, antiepileptici, inhibitori HMG-KoA reduktaze, ili opijati.

## Povećanje transaminaza kod raznih bolesti bolesti jetre

- Kod pacijenata sa povišenim vrednostima transaminaza, negativni virusni markeri ili negativna istorija uzimanja lekova i alkohola, treba posumnjati na ređe bolesti poput:
- hemohromatoze, Vilsonova bolest, autoimunihepatitis, primarna bilijarna ciroza, sklerozirajući holangitis i deficijencija alfa-1-antitripsina.

# Klinički značaj transaminaza

## Karcinomi

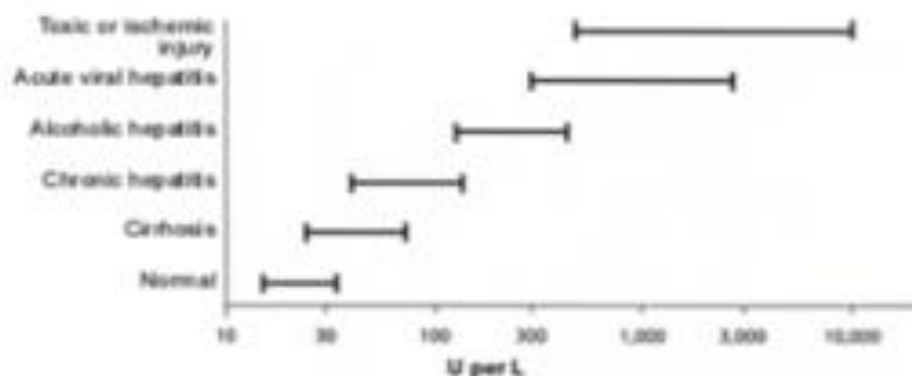
- Povećanje od 2 do 5 puta oba ova enzima se javlja kod pacijenata sa primarnim karcinomom jetre ili sa metastazama karcinoma na jetri
- Obično je AST viši od ALT
- Vrednosti su obično normalne u ranim stadijumima maligne infiltracije jetre

## Opstruktivne bolesti

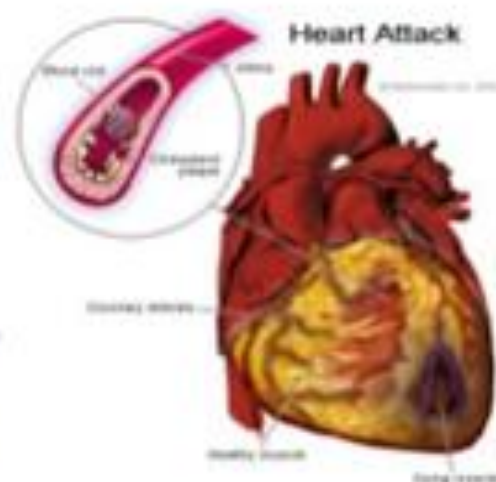
- Povećane aktivnosti transaminaza su dobijene kod ekstrahepatične holestaze, pri čemu su aktivnosti više ukoliko se radi o hroničnoj opstrukciji

## Klinički značaj transaminaza

- Iako su aktivnosti AST i ALT uvek zajedno povećane kada neka bolest ošteti integritet jetrenih ćelija, ALT je specifičniji jetreni enzim
- Povećanje serumske aktivnosti ALT je vrlo retko izuzev oboljenja kod kojih dolazi do parenhimskog oštećenja jetre
- Povišene aktivnosti ALT ostaju duže u odnosu na povišene vrednosti AST
- Pitanje da li treba određivati AST pored ALT ?



# Klinički značaj transaminaza Aspartat aminotransferaza



## Bolesti srca

- Posle akutnog infarkta miokarda, povišene aktivnosti AST u serumu zbog visokih aktivnosti AST u srčanom mišiću

## Mišićne bolesti

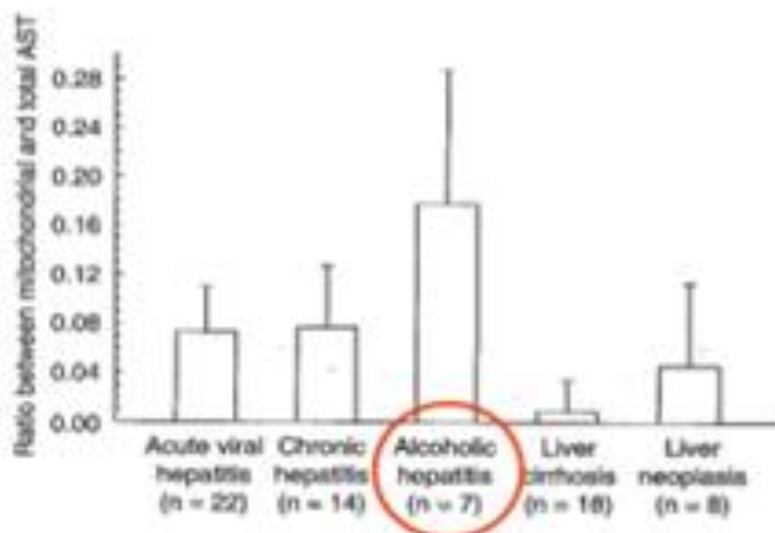
- AST je povišen i u progresivnoj mišićnoj distrofiji i dermatomiozitisu
  - povećane aktivnosti i do osam puta u odnosu na normalne
- AST normalan u mišićnim oboljenjima sa neurološkim poreklom
- Oštećenje poprečno prugastih mišića uporedni porast AST i CK

## Druge bolesti

- Embolija pluća može povećati AST dva do tri puta,
- Slaba povišenja su detektovana kod:
  - celijačne bolesti, akutnog pankreatitisa, mišićnih povreda i hemolitičkih bolesti

## Mitochondrijalna AST

- Generalno aktivnost mitohondrijalne AST (m-AST) u serumu pokazuje povećanje kod pacijenata sa ekstenzivnom degeneracijom i nekrozom jetrenih ćelija
- Važan je odnos m-AST i ukupne aktivnosti AST kod alkoholnog hepatitisa.
- Ovaj odnos jasno identifikuje stanje sa **nekrotičnim tipom** oštećenja jetrenih ćelija
- Alkoholni hepatitis
  - Slabo povećanje enzima
  - Veće povećanje mitohondrijalnog enzima



# Makro-AST

- Makro forma AST- makro-AST je enzim AST vezan za imunoglobuline
- Tipičan nalaz:
- Stalno povećana aktivnost serumske AST kod asimptomatskih bolesnika, sa nepostojanjem bilo kakve patologije u organima bogatim sa AST
- Povišene vrednosti AST mogu da reflektuju smanjen klirens ovog abnormalnog kompleksa iz plazme
- Makro-AST nema kliničke posledice
- Identifikacija makroforme je važna da bi se izbegle nepotrebne dijagnostičke procedure kod ovih osoba
- Laboratorijska dijagnostika makro AST elektroforetski

## Referentne vrednosti aminotransferaza

- Metode sledjive referentnoj IFCC metodi:
- AST gornja granica (97,5-pecentil referentne distribucije) **35 U/L**

### Uticaj pola

- AST nema razlika prema polu
- ALT pokazuje razlike između muškaraca i žena.
- Gornja granica je **60 U/L** za muškarce i **42 U/L** za žene.

### Uticaj godina

- ALT nema razlika po godinama kod dece
- AST je povećana kod beba i dece do 3 godine 2x viša nego kod odraslih u pubertetu se izjednačavaju



## Zaključci

### Tumačenje kliničkog značaja transaminaza

#### Povećan samo ALT

- Verovatno je u pitanju bolest jetre

#### Povećan samo AST

- Moguća bolest jetre, srca i skeletnih mišića

#### Povećan i ALT i AST

- Verovatno je u pitanju bolest jetre

# *Oboljenja jetre*

- **CHOLENESTERASE**
- *Prisutna u nervnom tkivu, eritrocitima i jetri*
- *Referentne vrijednosti 0.6-2.4 U/L*
  
- *Signifikantno povećanje*
- *Trovanje organofosfatnim otrovima (isekticidima)*
- *Oboljenja jetre*

# *Oboljenja jetre*

- **GAMA GLUTAMIL TRANSFERAZE ( $\gamma$ GT)**
- *Prisutna u jetri, bubrezima, pankreasu i prostati*
- *Referentne vrijednosti: Muškarci: 30 U/L*  
*Žene < 25 U/L*
- *Signifikantno povećanje:*
- *Indukovano alkoholom ili lijekom fenobarbitonom*
- *Hronični alkoholni hepatitis*
- *Holestatske bolesti jetre*

# Oboljenja jetre

## ALKALNA FOSFATAZA (ALP)

- **Signifikantno povećanje:**
  - *Oboljenja kostiju kao što je osteomalacija, rahitis, Padžetov osteogenetski karcinom, i sekundarni depoziti u kostima.*
  - *Oboljenja jetre kao što je holestaza, tumor ili intoksikacija lijekovima*
  - *Tumor: kosti ili jetre, primarni ili sekundarni depoziti*

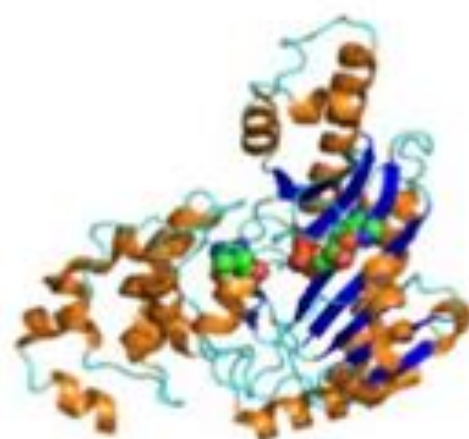
# *Oboljenja jetre*

- *ALKALNA FOSFATAZA (ALP)*
- *Prisutna u kostima, hepatobilijarnom, intestinalnom traktu, renalnim tubulima i placenti*
- *Referentne vrijednosti*
- *Muškarci: 40-258 U/L*
- *Žene: 35-258 U/L*

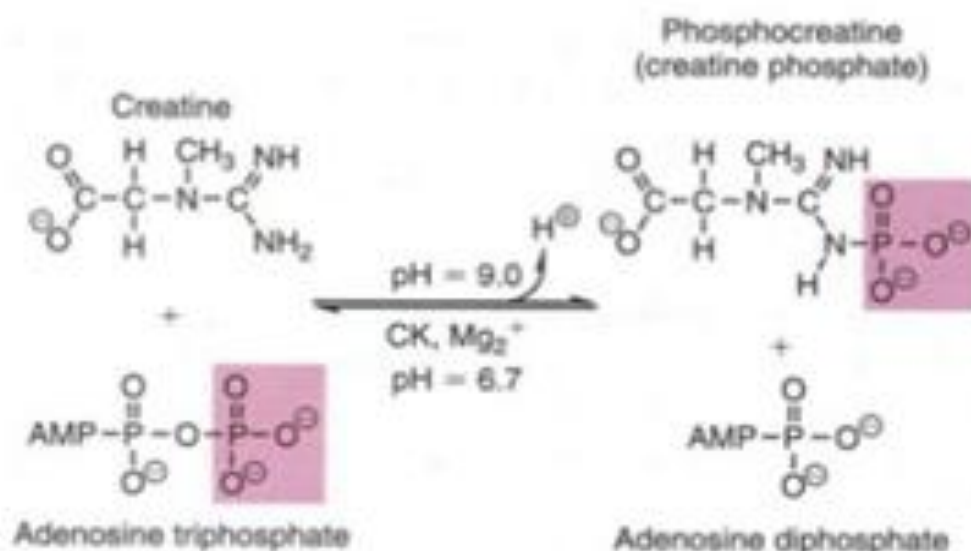
# ***KREATIN KINAZA***

## Kreatin kinaza

- Kreatin kinaza
- EC 2.7.3.2;
- adenzin trifosfat: kreatin N-fosfotransferaza
- Skraćenica CK (creatine kinase)
- Stari naziv: kreatin fosfokinaza CPK



## Kreatin kinaza



### Uticaj pH

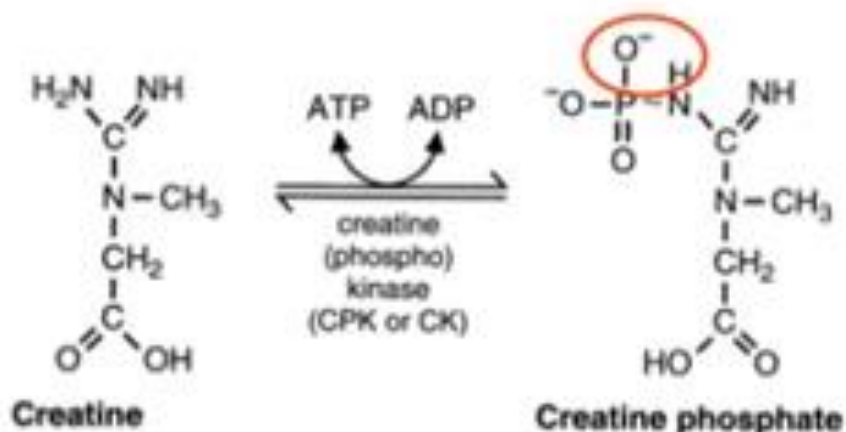
Pri neutralnom pH, CrP ima mnogo veći kapacitet fosforilacije nego ATP, ovaj viši potencijal favorizuje reversnu reakciju tj stvaranje ATP iz CrP.

Reversna reakcija se odvija 2 do 6 puta brže nego prva reakcija, zavisno od uslova. Optimalan pH reakcije je 9,0 a reversne reakcije je 6,7.



## Uloga CK u metabolizmu

- Glavna uloga CK je da učestvuje u obezbeđivanju energije
- ATP je „moneta“ u ćelijskom metabolizmu
- ATP se stvara u mitohondrijama u procesu ćelijske respiracije
- Najveći potrošači energije su mišići i mozak jer su oni metabolički najaktivnija tkiva
- Kreatin fosfat - depo energije
- Kreatin kinaza - trenutni pufer za energiju
- Visoko energetska veza je neuobičajena azot-fosfatna veza.



## Distribucija kreatin kinaze u organizmu

- Kreatin kinaza je vezana za mesta gde se energija oslobađa (mitohondrije) ili troši (metabolički aktivna tkiva)
- Reakcija je kuplovana za glikolizu i aktin-miozinski sistem
- Aktivnost kreatin kinaze je najveća u:
  - poprečno prugastim mišićima i
  - srčanom mišiću, koji sadrže 2500 i 550 U/g proteina.
  - mnogo manju aktivnost CK imaju mozak,
  - GIT, mokraćna bešika.
- U ćeliji kreatin kinaza je lokalizovana u citoplazmi ili vezana za miofibrile i u mitohondrijama

## Kreatin kinaza: citoplazmatična i mitohondrijalna

Kreatin kinaza

```
graph TD; A[Kreatin kinaza] --- B[Izoenzimi]; A --- C[Makro forme]; A --- D[Izoforme];
```

Izoenzimi

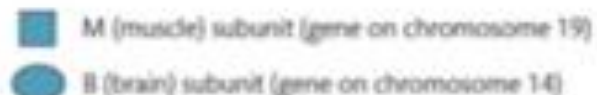
Makro forme

Izoforme

# Izoenzimi CK

## Citoplazmatski izoenzimi

- CK je dimer
- Subjedinice M i B (svaka po 40.000 kDa)
- Genski lokus na hromozomu 14 i 19



Tri citoplazmatska izoenzima:

- CK-BB ili CK-1 moždani izoenzim
  - CK-MB ili CK-2 srčani izoenzim (hibridni)
  - CK-MM ili CK-3 mišićni izoenzim
- 
- Komisija za biohemijsku nomenklaturu preporučuje da se izoenzimi obeležavaju na bazi njihove elektroforetske pokretljivosti
  - Izoenzimom koji najviše anodno putuje dobija najmanji broj
  - Na osnovu toga izoenzimi CK su obeleženi kao CK-1, CK-2 i CK-3.



## Distribucija kreatin kinaze i njenih izoenzima u organima

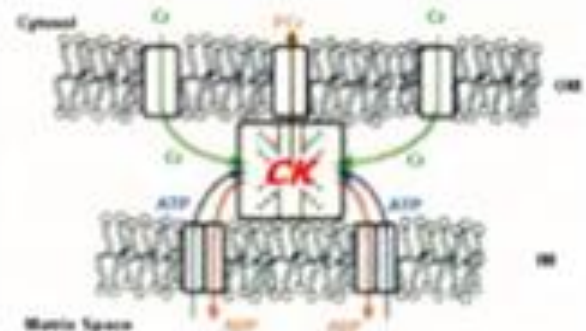
Relativne aktivnosti pojedinih citozolnih izoenzima CK u tkivima

**TABLE 7.1** The percentage distribution of the isoenzymes of creatine kinase (see Figure 7.3 (a)).

Isoenzyme	Brain	GIT	Cardiac muscle	Skeletal muscle
CKBB (CK1)	100	95-96	1	0
CKMB (CK2)	0	1-2	22	3
CKMM (CK3)	0	3	77	97

## Mitochondrijalna kreatin kinaza

- Pored ovih citozolnih postoji i četvrti izoenzim
- Razlikuje se imunološki i na osnovu elektroforetske pokretljivosti
- CK-Mt izoenzim je lociran između unutrašnje i spoljašnje membrane mitohondrija
- U srcu on čini 15% od ukupne CK aktivnosti
- Dve forme mitCK
- Sarkomerna
- Ubihinonska

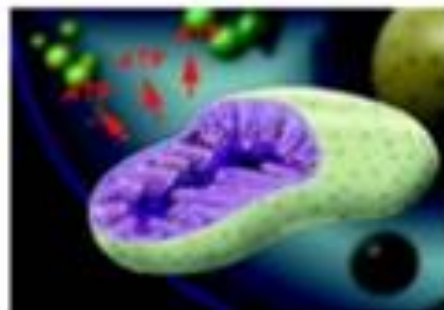
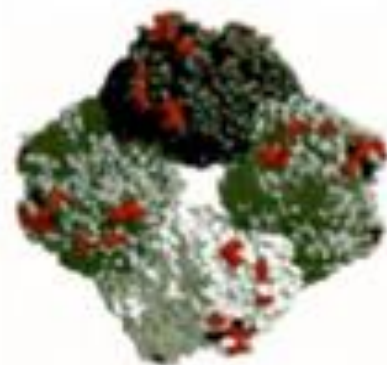


# Izoenzimi CK

## Mitohondrijalni izoenzimi

- Gen za mitCK je na hromozomu 15
- Struktura CK-Mt
  - Oligomerni izoenzim
  - **Oktamer**
- Uloga mitohondrijalne CK
- **Kreatinfosfat/kreatin šatl sistem**
- Prenosi kreatin fosfat iz mitohondrija na citozolnu kreatin kinazu koja predaje ATP kuplovanim ATPazama poput aktin-miozin (kontrakcija mišića) ili jonski transporteri koji su ATP-zavisni (transport Ca iz sarkoplazmatičnog retikuluma)
- Kreatin fosfat nije samo energetski pufer već i prenosilac energije iz organele gde se proizvodi ATP do mesta utroška

oktamer



# Geni kreatin kinaze

*Geni za dve subjedinice su na različitim hromozomima:  
B na 14q32 i M na 19q13.*

gen

[CKB](#)

[CKBE](#)

[CKM](#)

[CKMT1A](#), [CKMT1B](#)

[CKMT2](#)

protein

kreatin kinaza, brain -mozak, BB-CK

Kreatin kinaza, ektopična ekspresija

kreatin kinaza, mišićna, MM-CK

kreatin kinaza mitohondrijalna 1;  
ubiquitous mtCK; ili  $\mu$ -mtCK

kreatin kinaza mitohondrijalna 2;  
sarkomerna mtCK; or  $\mu$ -mtCK



## Kreatin kinaza

- Kinetičke karakteristike kreatin kinaze
- Uticaj Mg(II) jona:
  - gradi kompleks sa ATP i ADP
  - aktivacija (uski opseg koncentracije Mg jona)
  - i inhibicija jonima Mg
- Inhibitori reakcije:
  - Mn, Zn, Ca, Cu
  - joni: hloridi, bromidi, fluorid, jodoacetat, citrat, sulfat, ADP u višku,
  - urati i cistein inhibitori u serumu
  - važno održavanje koncentracija Cl i sulfata
- Značaj SH grupa
- enzim nestabilan zbog SH grupa
- Reagensi koji reaktiviraju CK
  - N-acetil cistein, monoliolglicerol, ditioeritriol, ditiotreitol (Clelandov reagens) i glutation
  - najbolji N-acetilcisten u koncentraciji od 20 mmol/L u reakcionoj smesi

## Fiziološke varijacije CK

- Pol
- Mišićna masa
- Fizička aktivnost
- Rasa
- Godine



## Klinički značaj CK

Povećane vrednosti CK kod bolesti srca i skeletnih mišića zbog:

- povreda
- inflamacija
- nekroze

Određivanje CK ima klinički značaj kod:

- Bolesti skeletnih mišića
- Akutnog infarkta miokarda
- Oštećenja mozga

## Klinički značaj CK

- Infarkt miokarda i oštećenja srčanog mišića
- Skeletni mišići: oštećenja i bolesti
- Hipotiroidizam
- Intramuskularne injekcije
- Generalne konvulzije
- Cerebralna oštećenja
- Maligna hiperpirekcija
- Produžena hipotermija

## Klinički značaj CK

### Mišićne bolesti

- Povišene vrednosti CK mogu biti jedini znak subkliničke neuromuskularne bolesti.
- 30-44 % asimptomatskih pacijenata sa hiper CK aktivnošću (5x veća od URL) ima miopatiju.
- Aktivnost serumske CK je mnogo povišena u svim tipovima **mišićne distrofije**.
- U progresivnom tipu mišićne distrofije, kakva je Dušenova distrofija aktivnost enzima je najveća u detinjstvu od 7 do 10 godine i može biti povećana dugo vremena pre nego što se klinički ispolji.
- Serumska CK posle opada pošto pacijenti postanu stariji jer se funkcionalna mišićna masa smanjuje sa progresijom bolesti.
-

## Dušenova mišićna distrofija

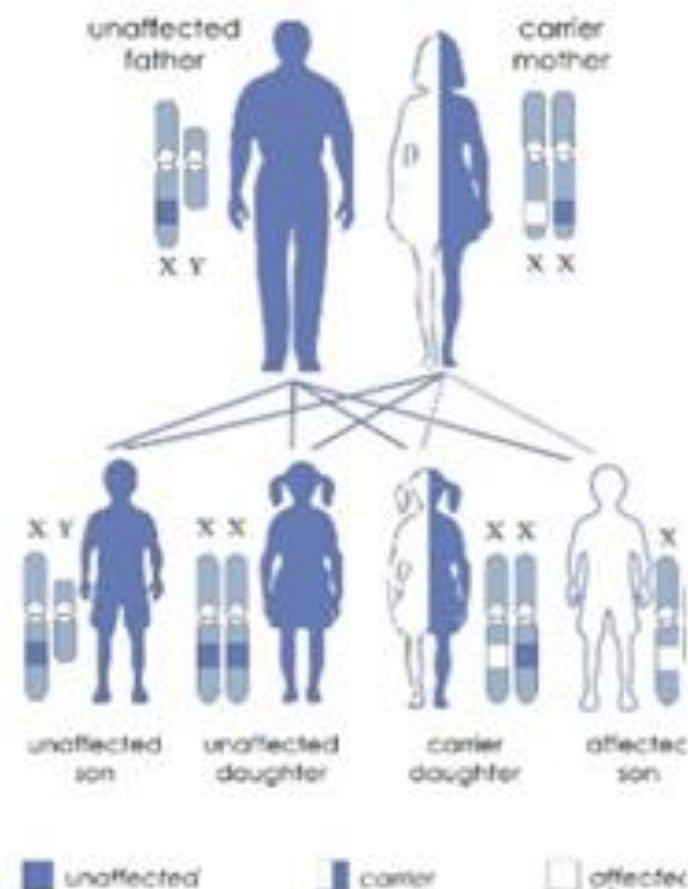
Vrednosti CK vrlo visoke kod obolelih  
Bolest vezana za pol

Žene su prenosioci gena

Kod 50 do 80 % žena nosioca gena za mišićnu distrofiju koje ne oboljevaju imaju povišen CK 3 do 6 puta.  
Vrednosti mogu pak biti normalne ako nema fizičke aktivnost

Značaj prenatalne dijagnostike

### X-linked recessive inheritance



## Klinički značaj CK

### Mišićne bolesti

- Visoke vrednosti CK su zabeležene kod
- virusnog miozitisa, polimiozitisa i sličnih bolesti mišića
- Kod neurogenih mišićnih bolesti:
- miastenia gravis, multipla skleroza, polimijelitis i parkinsonizam vrednosti CK su normalne
- Vrlo visoke vrednosti su kod maligne hipertermije, bolesti koja se manifestuje visokom groznicom i koja je izazvana davanjem inhalacione anestezije (halotan) kod obolele osobe.

# Klinički značaj CK

## Mišićne bolesti

- U akutnoj rambdomiolizi zbog kraš oštećenja, sa teškom destrukcijom mišića, vrednosti serumske CK aktivnosti su 200x URL
- Serumska CK može biti povećana i kod drugih trauma mišića
  - intramuskularne injekcije i hirurške intervencije.



- Postoje i lekovi koji u farmakološkim dozama povećavaju vrednosti CK u serumu:
  - statini, fibrati, antiretroviralni lekovi i antagonisti receptora angiotenzina II.
  - Razne vrste miopatija se mogu javiti kod davanja statina, blagi mijalgični sindrom pa sve do rambdomiolize (0,02 %).
- Fizička aktivnost
  - Fizički trening
  - Maratonci





## Praćenje efekta terapije hipolipidemicima Preporuke ESC/EAS 2011

- Praćenje neželjenih efekata statina:
  - rabdomijelize
  - hepatotoksičnost
- Određivanje aktivnosti enzima
  - CK
  - ALT
- CK se preporučuje kod pacijenata sa visokim rizikom za miopatiju
  - starije osobe sa drugim ko-morbiditetima
  - pacijenti sa ranijim mišićnim simptomima
  - mogućnost interakcije lekova



---

## Praćenje efekta terapije hipolipidemicima Preporuke ESC/EAS 2011

- Praćenje se preporučuje u intervalima od 6 do 12 meseci
- U cilju monitoringa potencijalnih toksičnih sporednih efekata
- Nema prediktivne vrednosti za CK kod rabdomiolize povećanje CK i kod oštećenja mišića i kod intenzivnog vežbanja
- CK se mora odmah odrediti, pogotovo kod starijih ako se jave bolovi u mišićima i slabost
- tretman da se obustavi ako su vrednosti **> 5 xULN**



---

## Praćenje efekta terapije hipolipidemicima

### Preporuke ESC/EAS 2011

- **Koliko često treba određivati CK kod pacijenata koji primaju hipolipidemičke ?**
  - Pre tretmana
  - Ako je bazalna vrednost CK  $> 8 \times$  URL ne započinjati terapiju
- **Monitoring**
  - Rutinski monitoring CK nije potreban
  - Proveriti CK ako se kod pacijenta javi mialgija
  - Povećati opreznost ako se radi o starijoj osobi, interferirajućim lekovima, uzimaju više lekova, prisutna bolest jetre ili bubrega
- **Šta treba uraditi ako se povećaju vrednosti CK kod pacijenata na terapiji hipolipidemicima ?**
- **$> 5 \times$  URL**
  - Zaustaviš tretman, proveriti funkciju bubrega i pratiti CK svake 2 nedelje
  - Proveriti da li je porast CK prolazno na primer zbog vežbanja
  - Isključiti druge uzroke koji mogu dovesti do miopatije ukoliko CK ostane povišen
- **$< 5 \times$  URL**
  - Ukoliko nema simptoma na mišićima nastaviti sa terapijom i savetovati pacijenta da prati promene na mišićima
  - Ukoliko se pojave simptomi , pratiti ih i regularno kontrolisati CK
  - Ponovno uvođenje terapije se može sprovesti tek kada se ALT vrati u normalu

## Klinički značaj kreatin kinaze

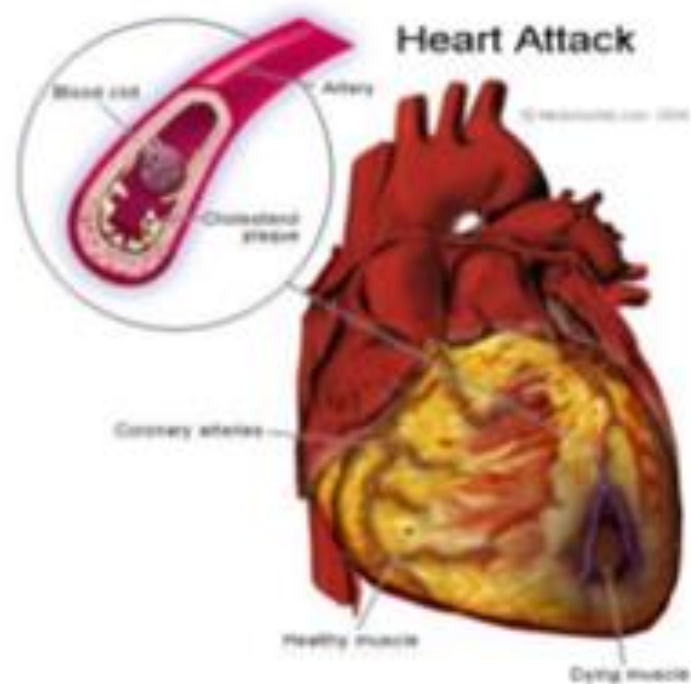
### Hipotiroidizam

- Aktivnost CK u serumu pokazuje inverznu povezanost sa funkcijom tiroideje
- Oko 60 % pacijenata sa hipotiroidizmom pokazuje prosečno povećanje CK od pet puta u odnosu na gornju granicu referentnih vrednosti
- Povećanje može biti i mnogo veće
- Glavni izoenzim koji se povećava je CK-MM, što ukazuje da je vezano za skeletne mišiće

## Klinički značaj CK i CK-BB

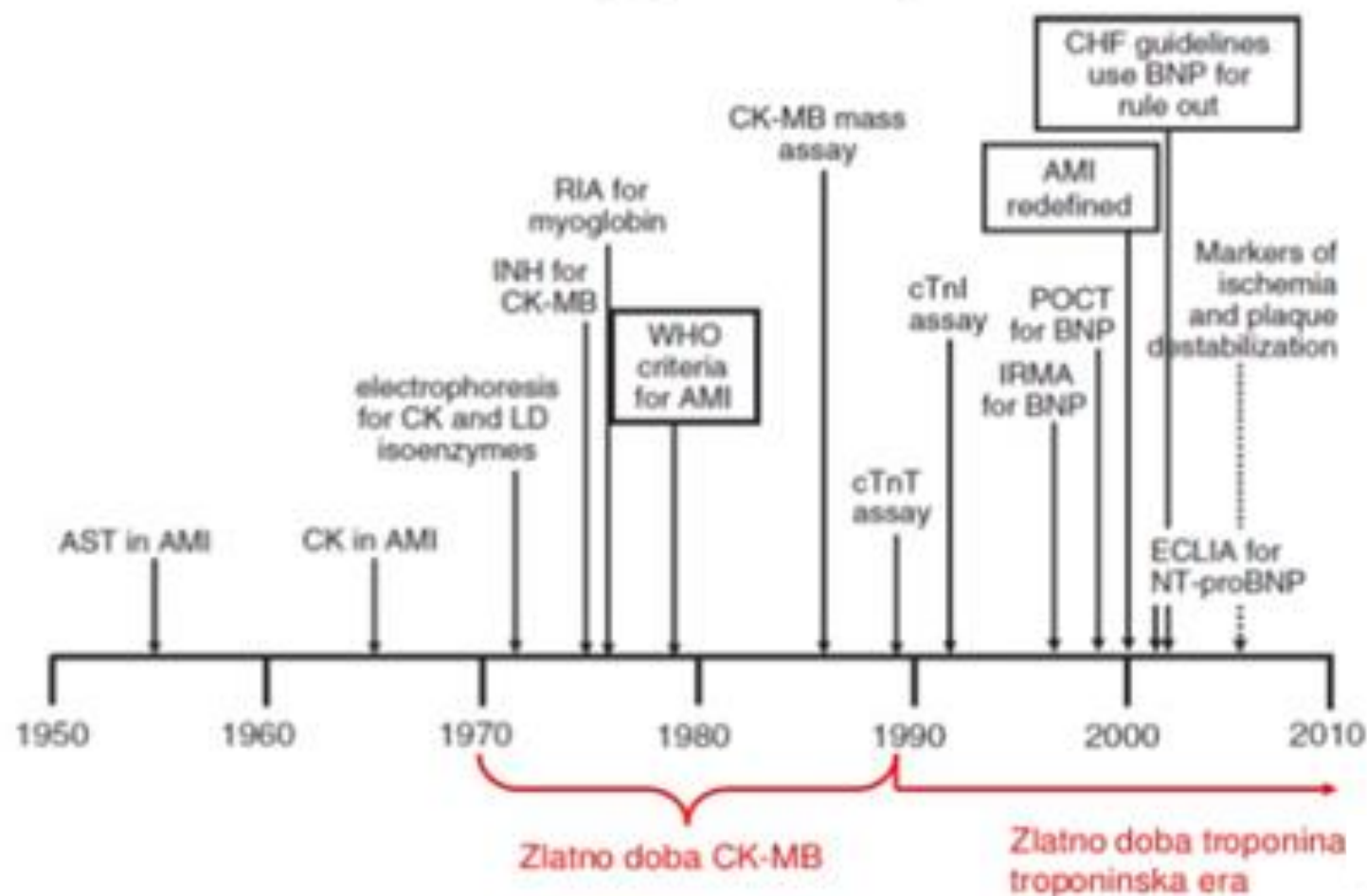
- U toku **porođaja** povećava se serumska CK kod majke i do 6 puta.
- Ukoliko je porođaj praćen i nekom **hirurškom intervencijom** povećanje je mnogo veće
- CK-BB može biti povećan kod beba, ako je **mozak oštećen** ili ako je mala težina novorođenčadi
- Pojava CK-BB u krvi u niskoj koncentraciji, može predstavljati i normalnu fiziološku pojavu nekoliko prvih dana života

## Klinički značaj CK i CK-MB u akutnom infarktu miokarda



- Promene CK i izoenzima CK-MB posle akutnog infarkta miokarda bili su glavni testovi u dijagnostici mnogo godina
- Markeri nekroze tkiva
- Sada se koriste mnogo kardio-specifičniji neenzimski markeri (citolni proteini) kao što su troponin I i troponin T

## Razvoj i primena biohemijskih markera oštećenja miokarda i njegove funkcije



## Dijagnoza akutnog infarkta miokarda

### Hronologija dijagnostike

- 1986. WHO uključeni biomarkeri
  - Prisutna dva kriterijuma od sledećih tri:
    1. Istorija bola u grudima
    2. Promene u ECG
    3. Povećanje biohemijskih markera 2x od normale
2000. godina ECS, ACC, revizija **2007. g**





## Kriterijumi za detekciju akutnog infarkta miokarda

Objedinjene preporuke: ESC/ACCF/AHA/WHF Task force

1. Detekcija porasta i/ili pada kardijačnih biomarkera (pre svega troponina) sa bar jednom vrednošću preko 99 –og percentila u odnosu na gornju granicu referentnih vrednosti, zajedno sa dokazom ishemije. Dokaz ishemije na osnovu bar jednog parametra:
  - a) Simptomi ishemije
  - b) Elektrokardiogram (EKG) promene za novu ishemiju (novi ST) ili novi blok leve grane (LLLB)
  - c) Razvoj patološkog Q talasa na EKG
  - d) Imaging tehnika za dokaz nove abnormalnosti miokarda tj abnormalnosti motiliteta regionalnog zida

**Redefinicija akutnog infarkta miokarda na osnovu vrednosti troponina**

# Biohemijski markeri ishemije i nekroze miokarda

## Biohemijski markeri akutnog infarkta miokarda

### *Aktuelni kardijačni markeri*

- CK MB masa
- Troponin: cTnT i cTnI
- Mioglobin

### *Budući markeri*

- Ishemijski modifikovan albumin  
IMA ischemic modified albumin
- Protein koji vezuje masne kiseline  
H-FABP (heart-fatty acid binding protein)
- Glikogen fosforilaza BB

### *Kardijačni markeri manjeg značaja*

- CK ukupna aktivnost
- CK izoenzimi
- CK-MB aktivnost
- AST
- LD ukupna aktivnost
- Izoenzimi LD
- HBD

## Klinička primena CK i CK-MB u dijagnostici akutnog infarkta miokarda

### I aktivnost CK

- Pik posle 18 sati

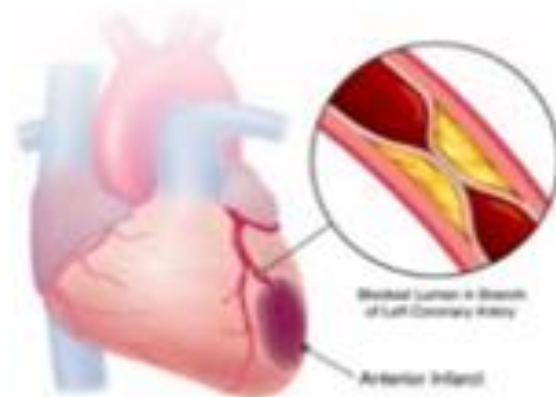
### II aktivnost izoenzima CK-MB

- Pik posle 6 sati

CK-MB je bio zlatni standard 20 godina u dijagnostici akutnog infarkta miokarda, zajedno sa EKG, istorijom bolesti i bolom u grudima

### III masena koncentracija CK-MB

- Ranija detekcija abnormalnih vrednosti
- Povećana senzitivnost
- Smanjena specifičnost zbog CK-MB iz mišića
- Interferencija makro-CK - nema



## Klinička primena izoformi CK u dijagnostici akutnog infarkta miokarda

### IV Izoforme CK

- Post-translacione modifikacije i uklanjanje lizina sa M subjedinice (pozitivno naelektrisan)
- Promene u elektroforetskom razdvajanju izoenzima CK
- CK-MM tj. CK-MM3 → CK-MM2 i CK-MM1
- CK-MB tj. CK-MB2 → CK-MB1
- **Veća senzitivnost i specifičnost u odnosu na izoenzim CK-MB**
  - **Specifičnost CK-MB1** 6 sati od bola je 95,7 % i 93,9 %
  - **Specifičnost CK-MB aktivnost** 6 sati od bola je 48,2 % i 94,0 %

### Problemi sa izoformama CK:

- Uticaj oštećenja skeletnih mišića
- Metoda separacije izoformi:
  - Specijalna elektroforeza na agarozu pri visokom naponu
  - Imunoekstrakcija sa specifičnim CK-MB2 antitelima

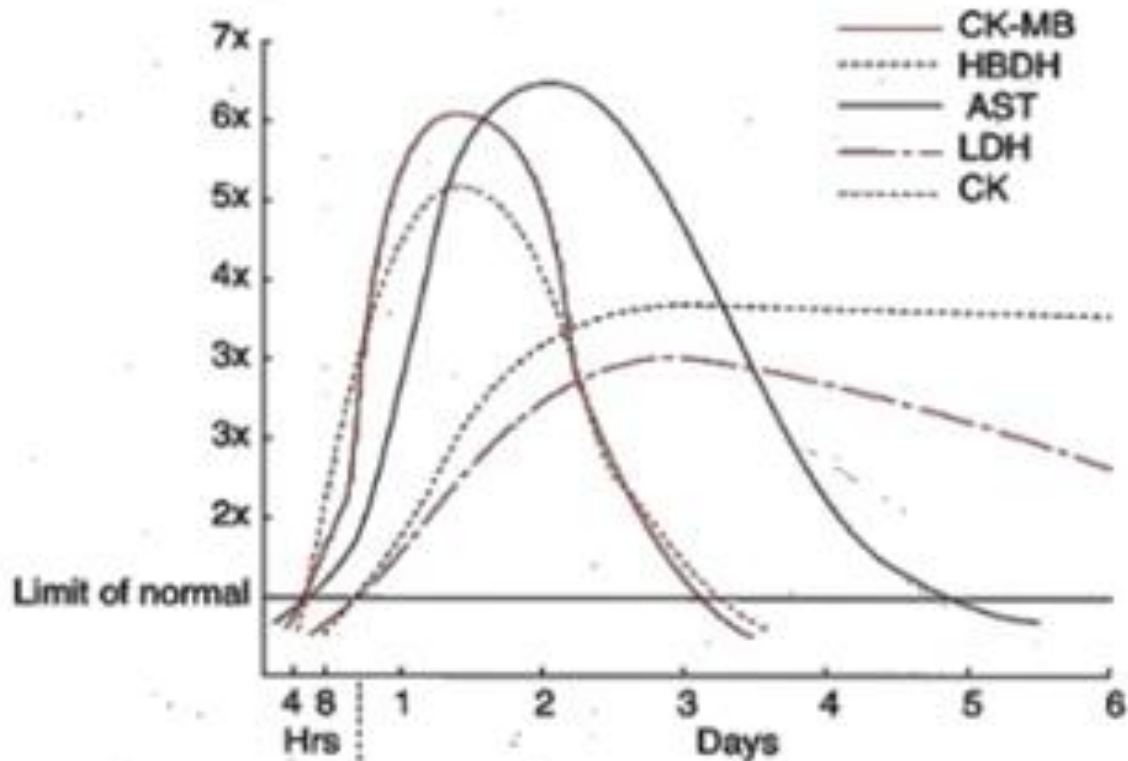


## Karakteristike CK MB kao biomarkera akutnog koronarnog sindroma

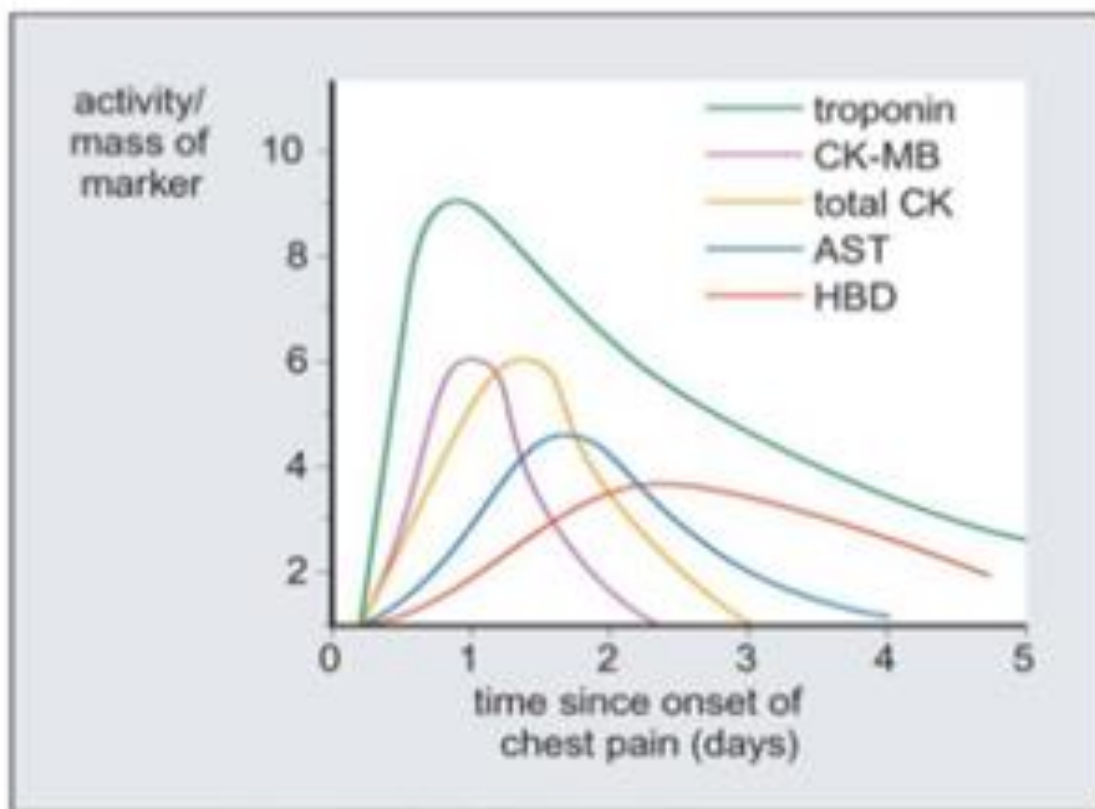
- Rani marker infarkta miokarda
- Oslobođanje 3-6 h posle pojave bola
- Maksimum oko 24 h
- Normalizacija 24-72 h
- Specifičan biomarker

# Dinamika promena enzima u akutnom infarktu miokarda

Zlatno doba CK-MB 1970.g-1990.g



## Dinamika promena enzima u akutnom infarktu miokarda Troponinska era



## Zaključci: Klinički značaj CK i CK-MB u akutnom infarktu miokarda

- Promene u CK i CK-MB izoenzimu posle akutnog infarkta miokarda bili su glavni testovi u dijagnostici mnogo godina.
- Sada se koriste mnogo kardio-specifičniji neenzimski markeri (citozolni proteini) kao što su troponin I i troponin T.
- **CK-MB masa se još uvek može koristiti uspešno za procenu širine miokardijalne nekroze i za procenu prognoze infarkta.**
- Kada se uporedi pik CK-MB sa veličinom infarkta, dobija se dobra korelacija.
- Problem kod korišćenja CK-MB masa za ovu svrhu je što mora često da se određuje CK-MB kako bi se našao pik vrednosti





## Granične vrednosti pika CK-MB i veličine infarkta

- Mikroskopski infarkt miokarda < 10 µg/L
  - Fokalna nekroza
- Mali infarkt miokarda 10-60 µg/L
  - <10 % leve ventrikule
- Srednja veličina infarkta 60-225 µg/L
  - 10-30 % leve ventrikule
- Veliki infarkt > 225 µg/L
  - >30 % leve ventrikule

## Klinički značaj CK i CK-MB u drugim bolestima srca



Pored infarkta i neka druga kardiološka stanja povećavaju vrednosti CK i CK-MB u serumu

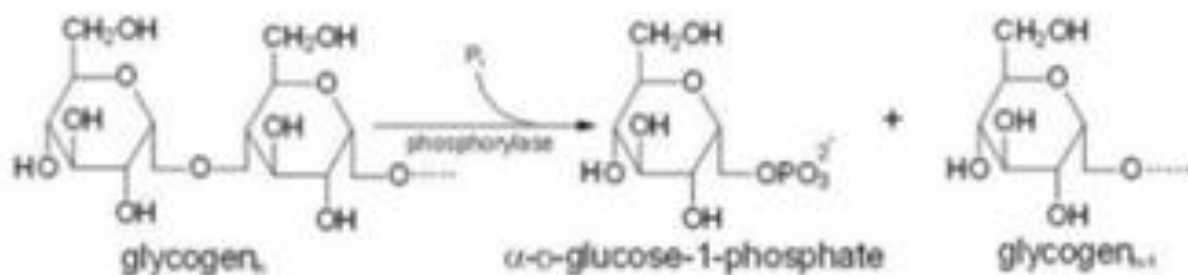
- kardiopulmonalni bypass
- koronarni arterijski bypass
- transplantacija srca
- miokarditis
- perikarditis
- pulmonalni embolizam

## Mišićni enzimi

- Kreatin kinaza
- Glikogen fosforilaza
- Aldolaza
- Laktat dehidrogenaza
- Aspartat aminotransferaza

# Glikogen fosforilaza

- EC 2.4.1.1;
- 1,4-alfa-D-glukan: ortofosfat alfa-D-glikoziltransferaza;
- Skraćenica GP
- Igra ključnu ulogu u metabolizmu ugljenih hidrata jer mobilizuje glikogen
- Katalizuje prvu reakciju u glikogenolizi u kojoj se glikogen prevodi u glukozu-1-fosfat



# Glikogen fosforilaza

R i T stanje glikogen fosforilaze



## Struktura i izoenzimi GP

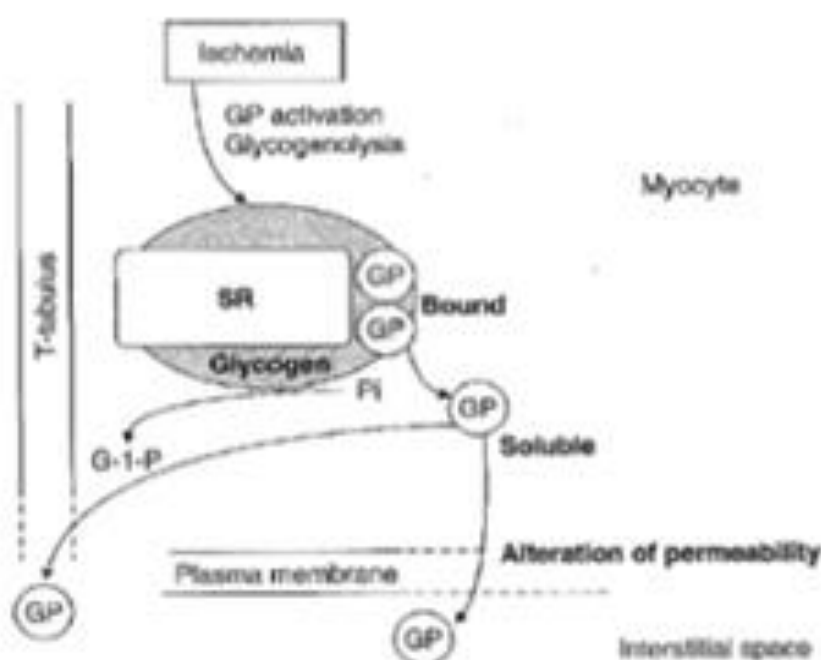
- GP postoji kao dimer i sastoji se iz dve identične subjedinice
- U humanom organizmu postoje tri izoenzima:
- GP-LL, GP-MM i GP-BB.

## Distribucija izoenzima:

- GP-LL u jetri
- GP-BB u humanom mozgu
- U srcu su GP-BB i GP-MM, ali dominantan izoenzim je **GP-BB**.

# Glikogen fosforilaza

- **Uloga mišićne glikogen fosforilaze**
- obezbeđuje dovoljno energije za mišićnu kontrakciju
- Lokacija u miocitima
- asocijacija sa glikogenom i sarkoplazmatičnim retikulumom i gradi **makromolekulski kompleks**.
- Step en asocijacije GP sa ovim kompleksom zavisi od metaboličkog stanja mišića



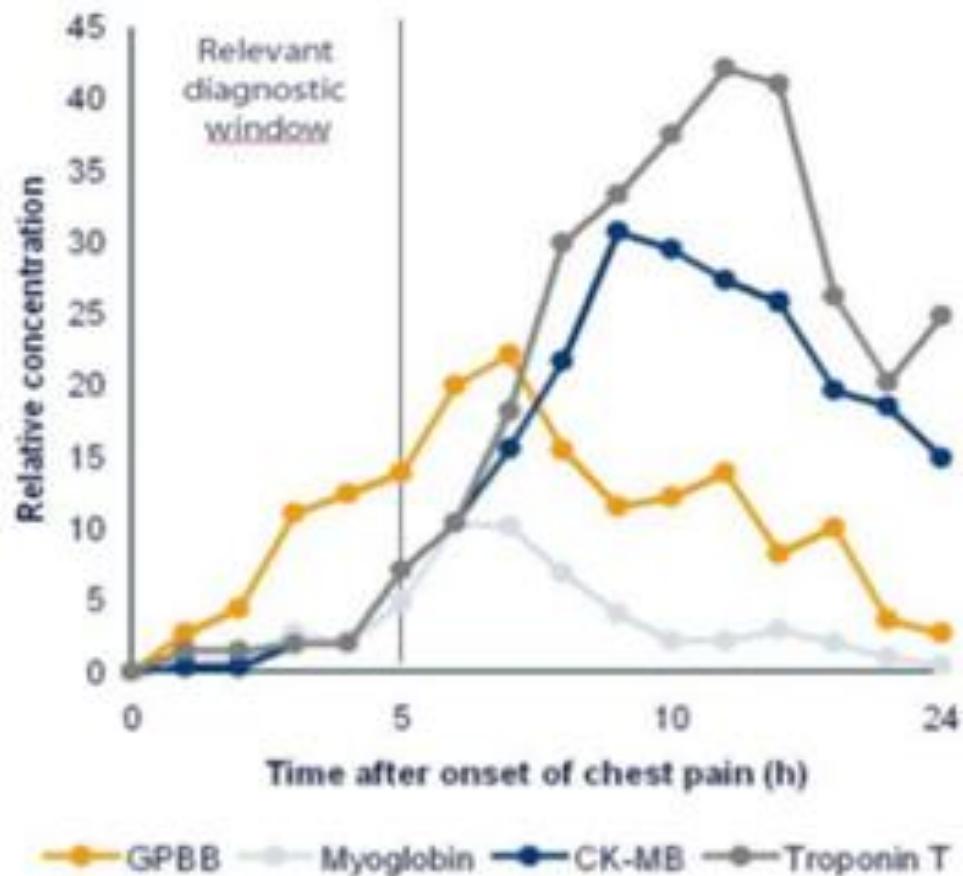
Kada dođe do tkivne hipoksije, glikogen se razlaže i nestaje, GP postaje rastvorljiv i može da se pomera sa odeljka peri-sarkoplazmatičnog retikuluma direktno u ekstracelularnu tečnost

## Klinički značaj određivanja glikogen fosforilaze i njenog izoenzima BB

- Preliminarna ispitivanja su polazala:
- GP-BB senzitivniji od CK i CK-MB za dijagnozu AIM u toku prvih **4 sata** od pojave bola u grudima
- Rani marker akutnog infarkta miokarda
- Slično drugim citoplazmatičnim proteinima kao što su mioglobin i CK-MB, dinamika GP-BB može biti pod uticajem reperfuzije koronarne arterije, sa mnogo bržim povećanjem i većim pikom.
- GP-BB nije specifičan protein za srce
- primena ograničena

## Klinički značaj određivanja glikogen fosforilaze BB u akutnom infarktu miokarda

### Dinamika promena GP BB

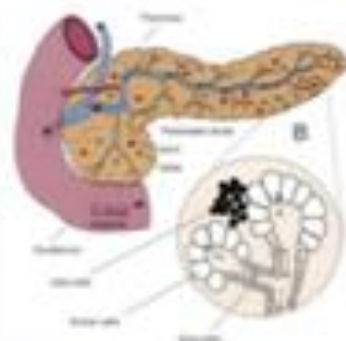




# ***PROTEOLITIČKI ENZIMI***

## Pankreasni enzimi

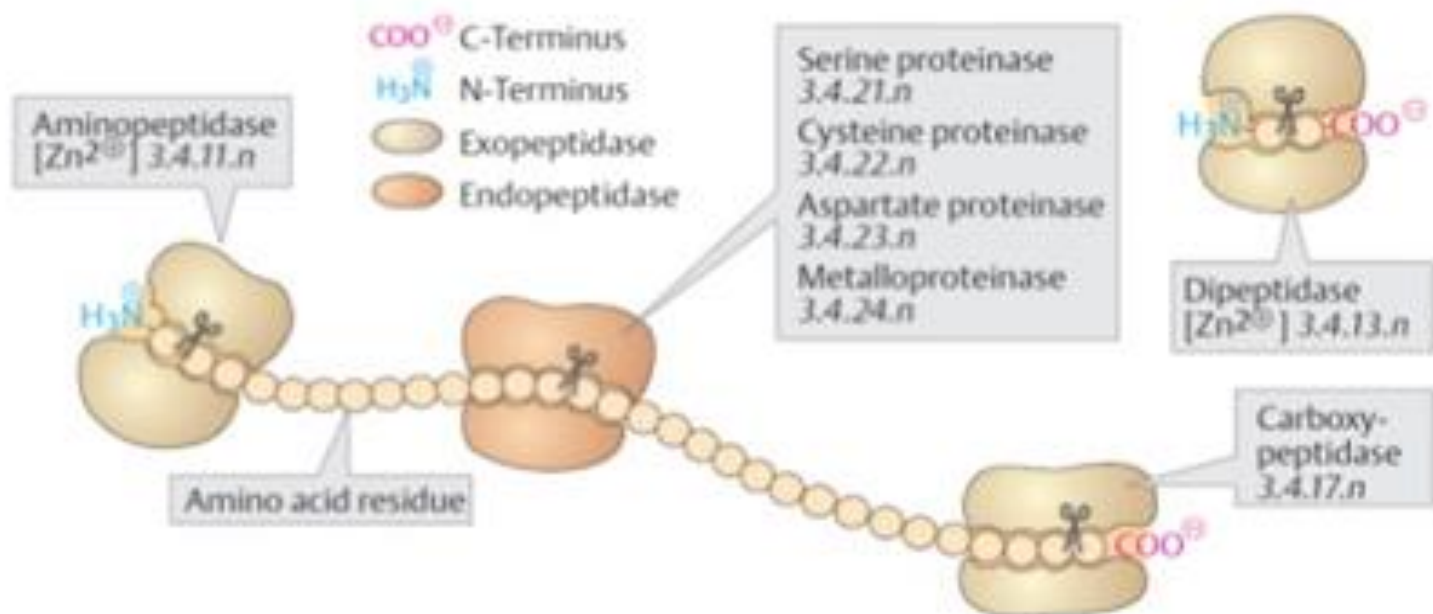
- Amilaza
- Lipaza
- **Proteolitički enzimi** - zimogeni enzimi
  - Tripsin
  - Himotripsin
  - Elastaza



# Proteolitički enzimi

- Peptidaze
  - Endopeptidaze i egzopeptidaze
  - **Endopeptidaze ili proteaze**
    - Serin proteaze
    - Cistein proteaze
    - Aspartat proteaze
    - Metalo-proteaze
  - **Egzopeptidaze**
    - Karboksipeptidaze
    - Aminopeptidaze
    - Dipeptidaze
-

## Mesta delovanja proteolitičkih enzima



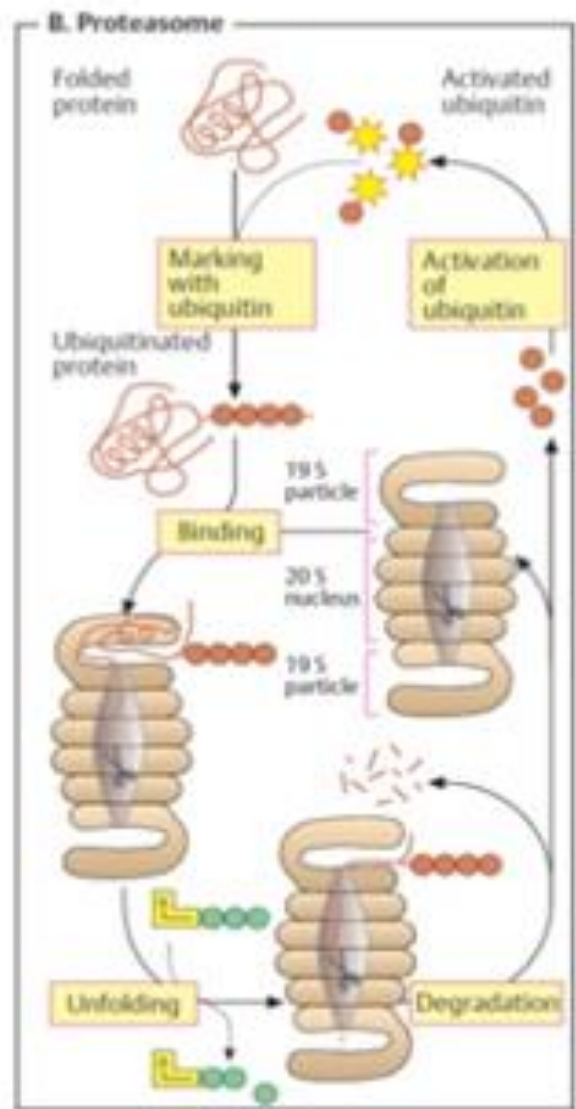
### Podela proteolitičkih enzima

1. Intracelularni
2. Sekretorni

# Intracelularni proteolitički enzimi

## Lokalizacija u ćeliji

- Lizozomi
  - Katepsini
    - Katepsini B,D i L
      - Tumor markeri
    - Katepsin S
      - Proaterogena svojstva
- Proteozomski kompleks



# Sekretorni proteolitički enzimi

## Uloga proteolitičkih enzima u varenju proteina

Varenje u želucu

Pepsin

Varenje u duodenumu

Tripsin

Himotripsin

Elastaza

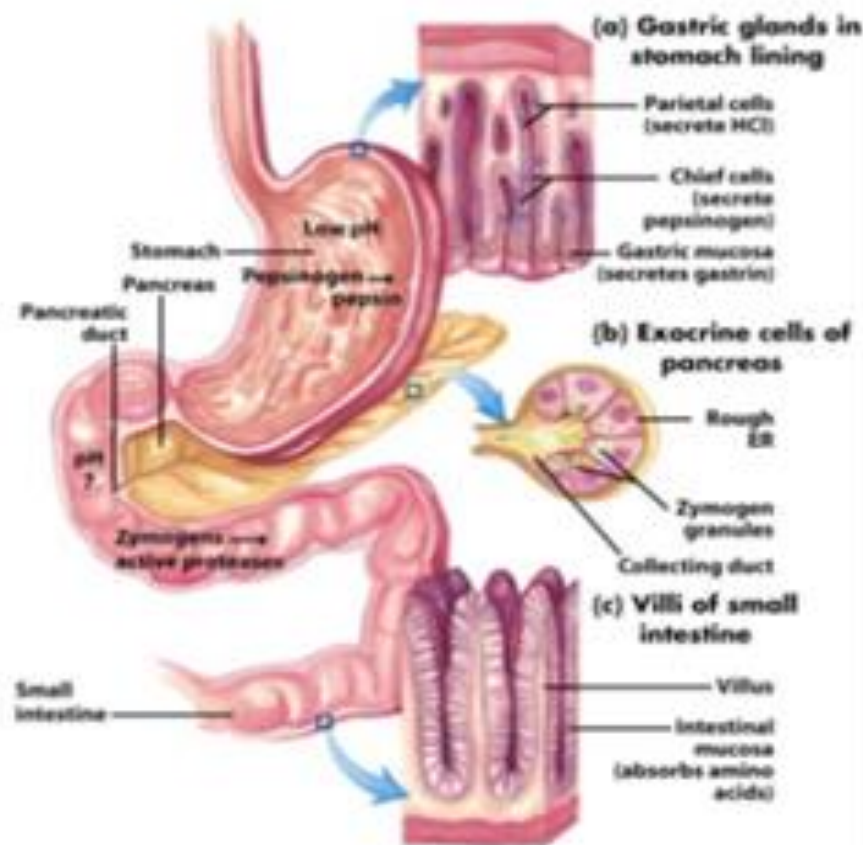
Karboksipeptidaze A i B

Varenje u tankom crevu

Endopeptidaze

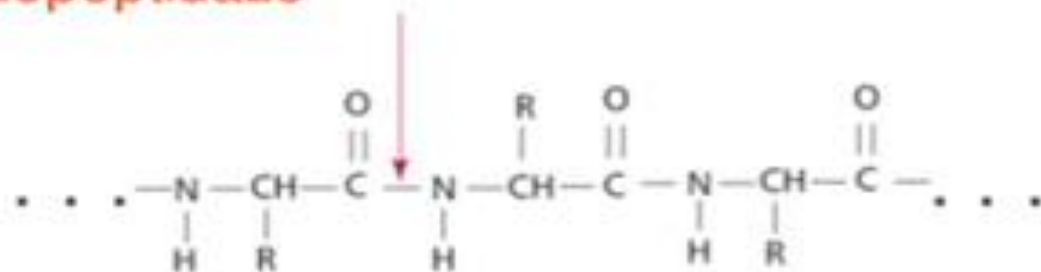
Aminopeptidaze

Dipeptidaze



# Varenje proteina: enzimi

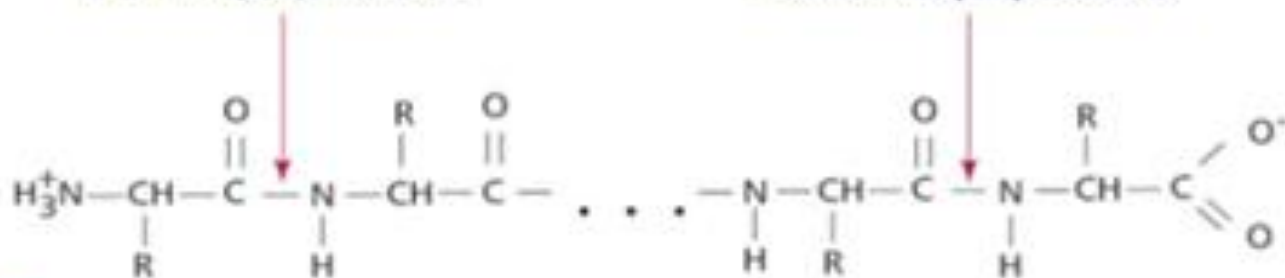
- Endopeptidaze



- Egzopeptidaze

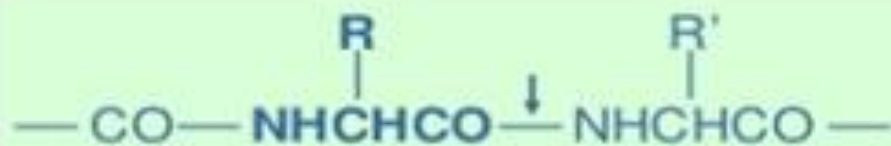
Aminopeptidaze

Karboksipeptidaze



# Varenje u želucu: Pepsini

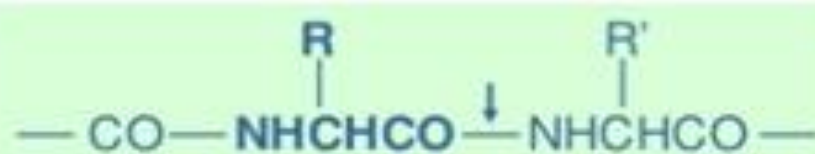
- Enzim: Pepsin A (karboksil-proteaza)
- Proenzim: Pepsinogen A
- Aktivatori:
  - Autoaktivacija (pepsinogen, pH < 5)
  - Autokataliza (pepsin)
- Specifičnost (R):
  - Phe
  - Tyr



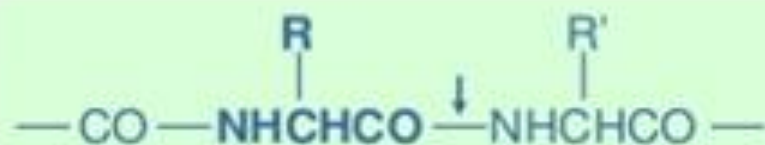


## Varenje u tankom crevu: Pankreasni enzimi

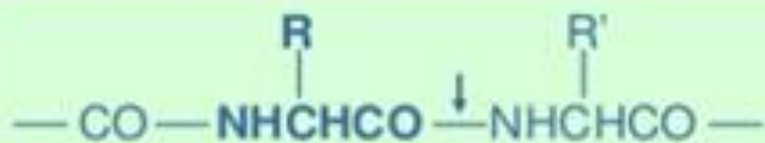
- Enzim: **Tripsin** (serin-proteaza)
- Proenzim: Tripsinogen
- Aktivatori:
  - Enteropeptidaza
  - Tripsin
- Specifičnost (R):
  - Arg
  - Lys



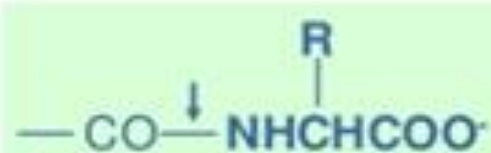
- Enzim: **Himotripsin** (serin-proteaza)
- Proenzim: Himotripsinogen
- Aktivator:
  - Tripsin
- Specifičnost (R):
  - Tyr, Trp, Phe, Met, Leu



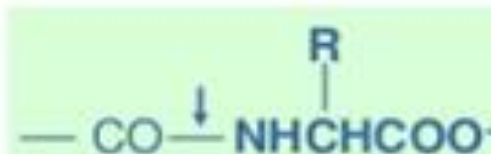
- Enzim: **Elastaza** (serin-proteaza)
- Proenzim: Proelastaza
- Aktivator:
  - Tripsin
- Specifičnost (R):
  - Ala, Gly, Ser



- Enzim: **Karboksiptidaza A** Proenzim: Prokarboksiptidaza A
- Aktivator:
  - Tripsin
- Specifičnost (R):
  - Val, Leu, Ile, Ala



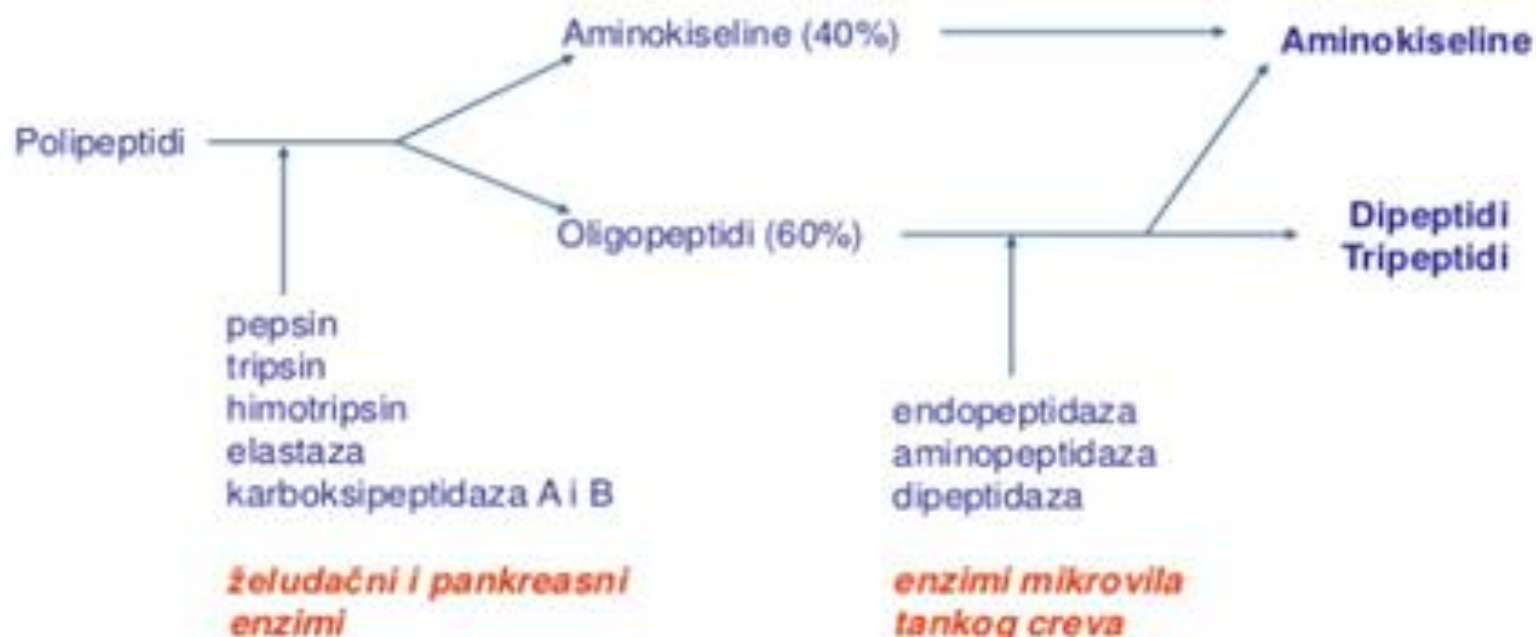
- Enzim: **Karboksiptidaza B**
- Proenzim: Prokarboksiptidaza B
- Aktivator:
  - Tripsin
- Specifičnost (R):
  - Arg, Lys



## Varenje u tankom crevu: Membranski enzimi mikrofila enterocita

- Endopeptidaze
  - Endopeptidaza 24.11 (hidrofobne aminokiseline)
- Aminopeptidaze
  - Aminopeptidaza A (kisele aminokiseline)
  - Aminopeptidaza N (neutralne aminokiseline)
  - Leucin-aminopeptidaza
- Dipeptidaze

# Varenje proteina: Rezime



# Serin proteaze

- Serin proteaze su članovi familije proteolitičkih enzima
- Sve one imaju u svom aktivnom centru **serin** što je ključno za funkciju ovih enzima
- Sve one cepaju peptidnu vezu sličnim mehanizmom
- Razlikuju se u svojoj specifičnosti i regulaciji

# Serin proteaze

U serin proteaze spadaju:

1. Pankreasne proteaze: tripsin, himotripsin i elastaze.
2. Razne intracelularne proteaze poput elastaze leukocita
3. Prohormon konvertaza (PC)
4. Faktori koagulacije su enzimi - serin proteaze
5. Fibrinolitički enzimi plazmin i njegovi aktivatori
6. Neki enzimi sistema komplementa

## Svojstva serin proteaza

Sinteza u vidu zimogena – inaktivna forma enzima

Aktivacija zimogena proteolitičkom hidrolizom

Aktiviraju se kada se mali delovi polipeptidnog lanca uklone

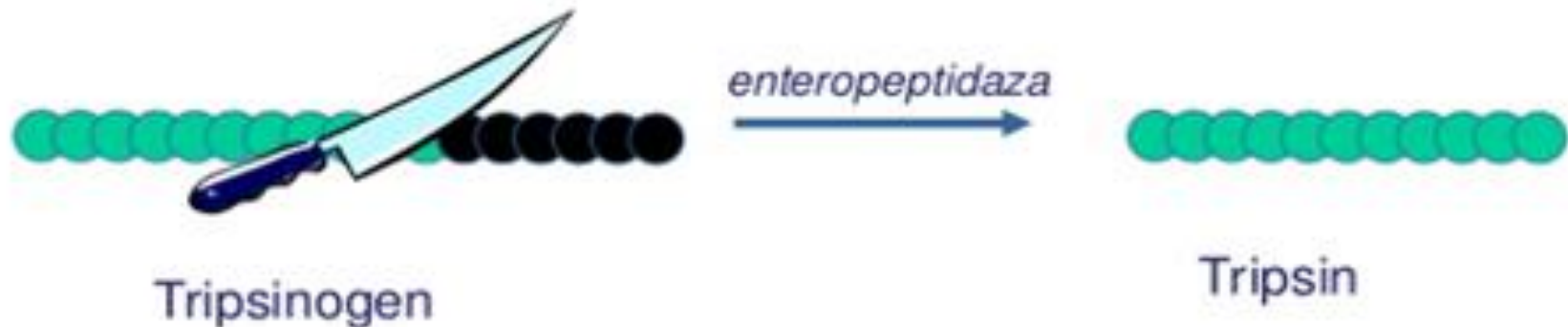


Hormoni,  
Digestivni enzimi,  
Faktori koagulacije



# Svojstva serin proteaza

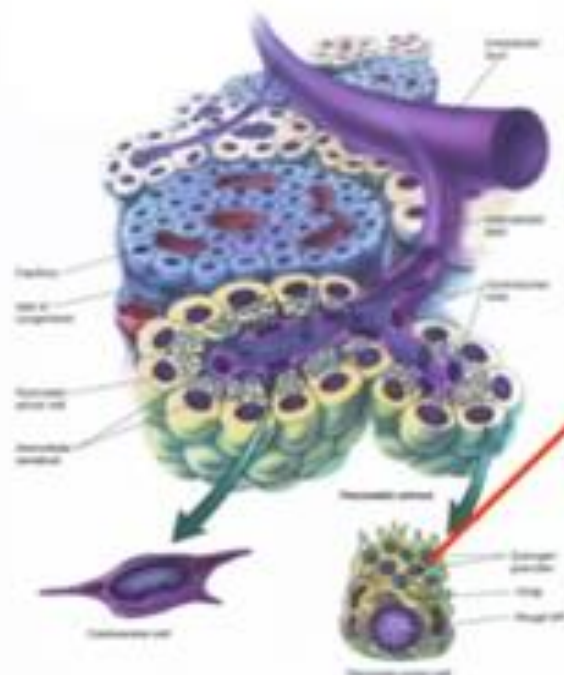
Aktivacija zimogena proteolitičkom hidrolizom  
Sposobnost autolize ili samo-hidrolize



Zimogeni enzimi pankreasa

- tripsinogen
- himotripsinogen
- proelastaza
- prokarboksipeptidaza

# Proteolitički enzimi pankreasa



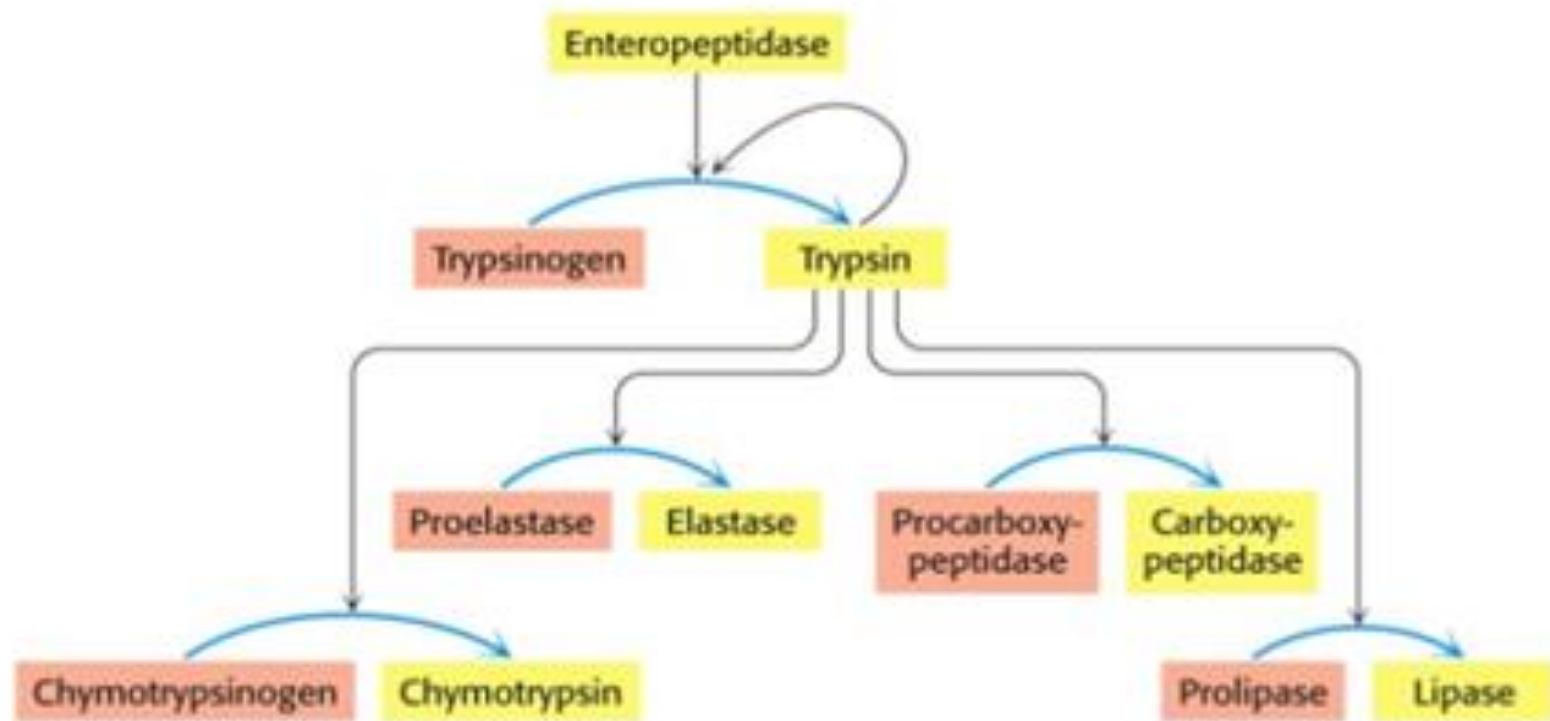
## Zimogeni enzimi

- tripsinogen
- himotripsinogen
- proelastaza
- prokarboksipeptidaza

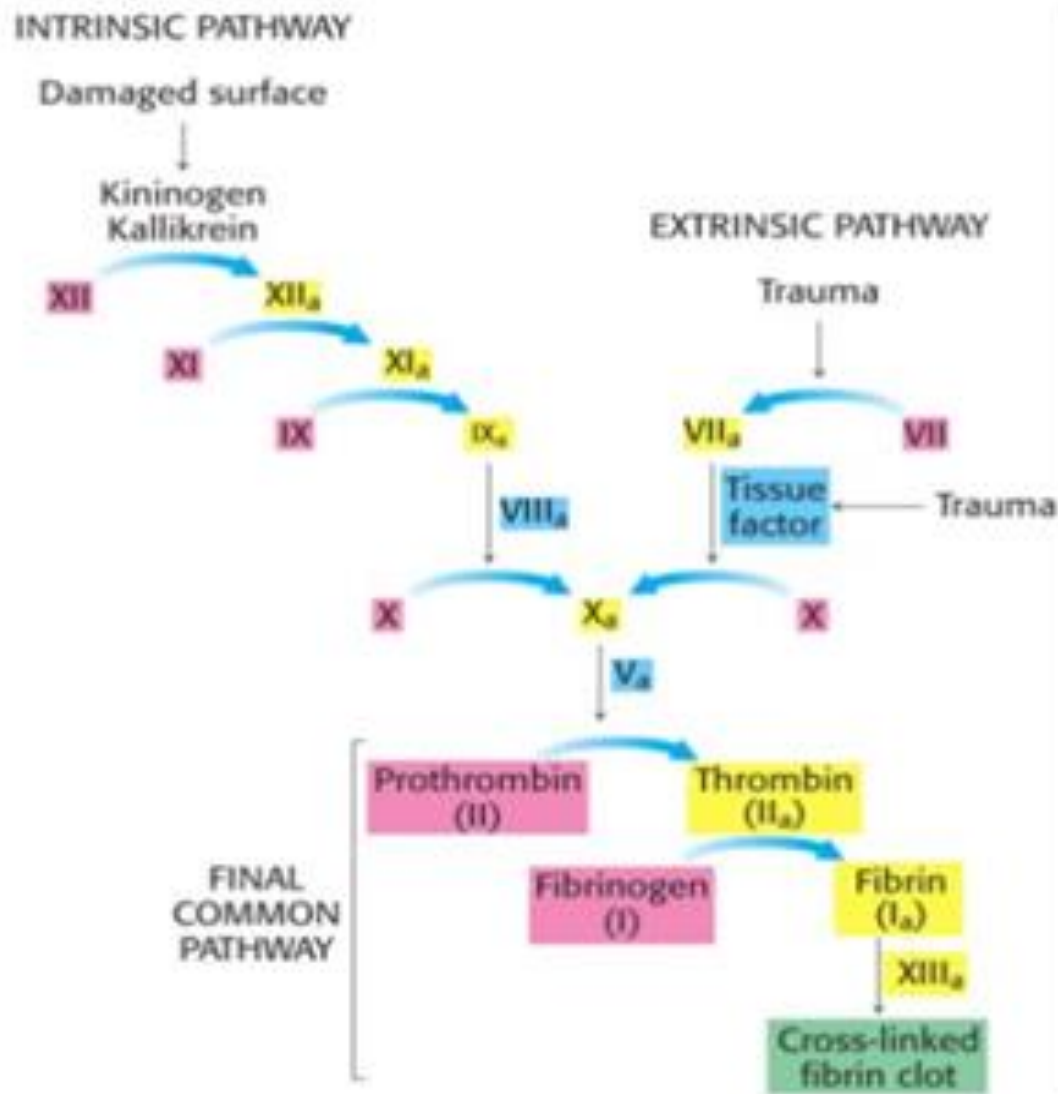
**(inaktivan)**  
**U pankreasu**

**(aktivan)**  
**u intestinumu**

## Aktivacija zimogena Kaskadne reakcije

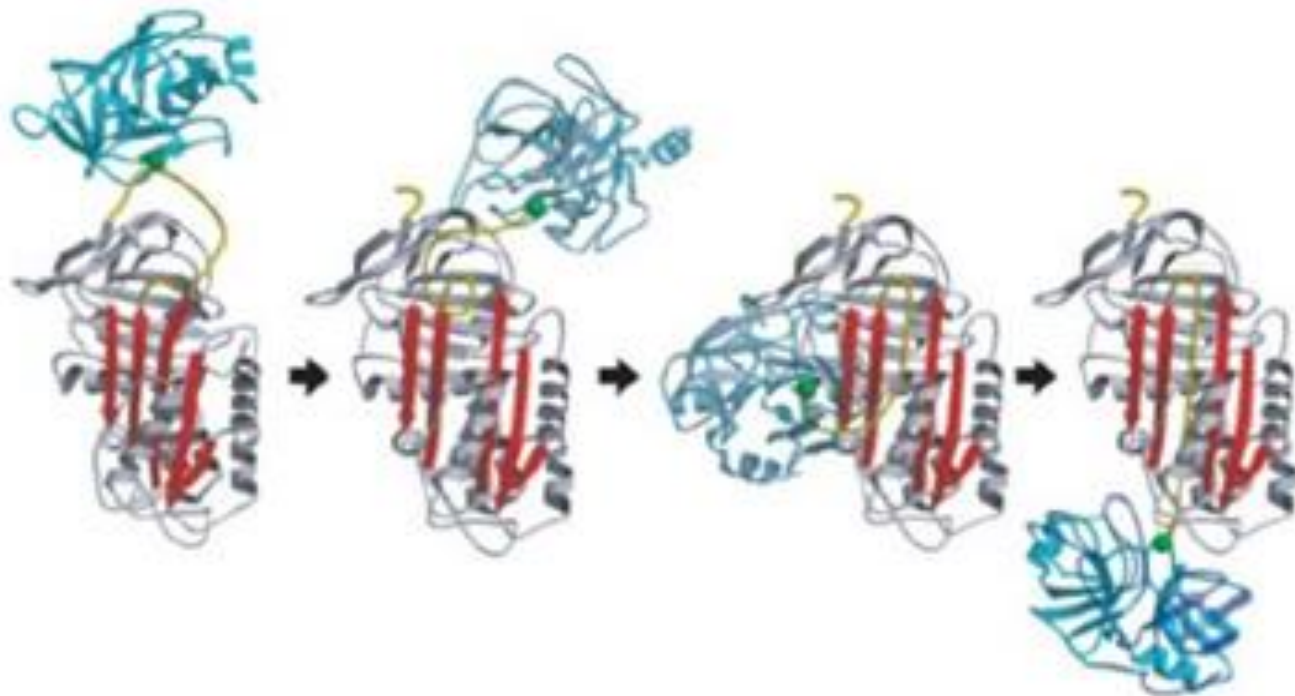


Proces koagulacije  
Aktivacija zimogena  
Kaskadne reakcije



# Inhibitori proteaza Serpini

- **SERPIN** (serine protease inhibitor)
- Inhibiraju serin proteaze pošto one završe svoje dejstvo



## Humani proteini inhibitori serin proteaza

- $\alpha_1$ -proteinaza inhibitor
- $\alpha_1$ -antihimotripsina
- Inter-  $\alpha$  - tripsin inhibitor
- $\alpha$  2-antiplazmin
- Antitrombin III
- C1 inhibitor
- A2makroglobulin
- Proteaza neksin I
- Proteaza neksin II
- Inhibitor aktivatora plazminogena I
- Inhibitor aktivatora plazminogena II

## Proteolitički enzimi u dijagnostici oboljenja pankreasa

- Tripsin
- Himotripsin
- Elastaza-1

Klinički značaj proteolitičkih enzima:

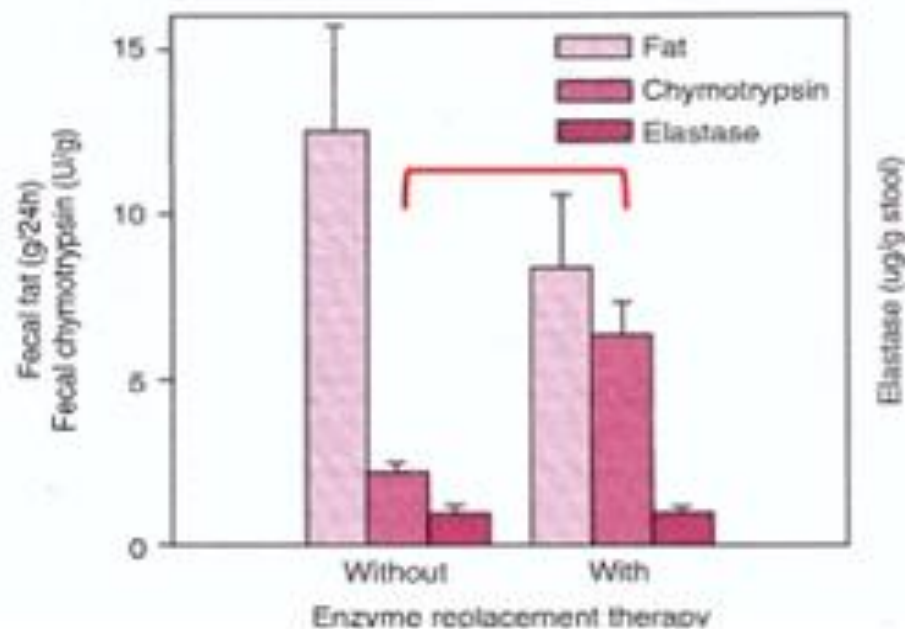
- Neinvazivni testovi za ispitivanje egzokrine funkcije pankreasa
- Diferencijalna dijagnoza pankreasne insuficijencije i malapsorpcije
- Enzimi u fecesu:
  - Himotripsin
  - Elastaza-1

## Klinički značaj himotripsina

- **Hronična pankreasna insuficijencija**
- Najveći značaj ima ispitivanje himotripsina u **fecesu** u cilju ispitivanja hronične pankreasne insuficijencije
- CHY u fecesu je obično snižen ispod donje granice referentnih vrednosti kod osoba sa steatorejom, ali nije koristan za identifikaciju osoba sa ranom pankreasnom insuficijencijom
- Merenje CHY u fecesu kod osoba sa hroničnom insuficijencijom pankreasa tretiranih suplementima pankreasnih enzimima može da ukaže da li je terapija adekvatna ili je potrebno povećati dozu



## Značaj određivanja himotripsina i elastaze-1 u fecesu kod praćenja efekta terapije



Tretman pankreasnim enzimima uticaj na nivo himotripsina u fecesu  
Ispitivanja na pacijentima sa cističnom fibrozom i steatorejom

# Elastaza-1

- Humana elastaza-1 (EC 3.4.21.36;)
- nema sistemsko ime; skraćenica E1
- Anjonska proteaza koja pripada porodici serin proteaza
- To je karboksipeptidaza koja katalizuje hidrolizu nativno elastina – glavnog strukturnog fibroznog proteina u vezivnim tkivima sa posebnim afinitetom za karboksilne grupe alanina, i leucina
- Humana E1 se sintetiše u acinarnim ćelijama pankreasa zajedno sa drugim digestivnim enzimima
- Sastoji se od 240 aminokiselina i Mm od 26000

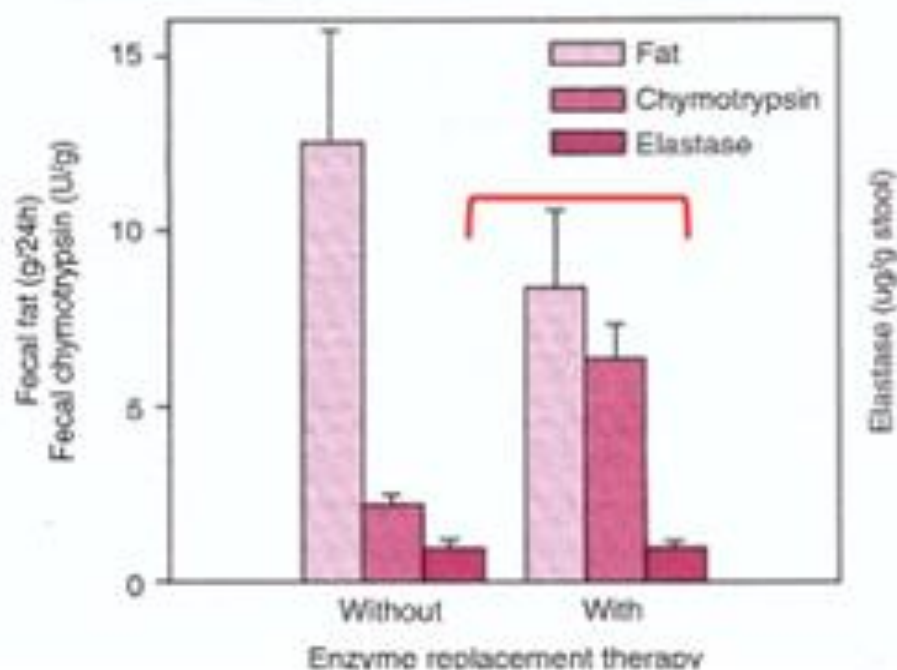
# Elastaza-1

- Enzim se sintetiše kao preproelastaza. Posle procesuiranja u proelastazu deponuje se u zimogenim granulama i posle se aktivira u elastazu pomoću TRY u duodenumu
- Elastaza-1 se minimalno degradira tokom prolaza u crevima
- Istorijski, svaka proteaza koja hidrolizuje elastin se naziva elastaza
- Kodirajući geni za elastazu su u klasteru na hromozomu 19
- Poznata su tri osnovna tipa enzima:
  1. Pankreasna elastaza-1 E1 (EC 3.4.21.36;)
  2. Pankreasna elastaza-2 (EC 3.4.21.71)
  3. Pankreasna endopeptidaze-3 (EC 3.4.21.70) koja se naziva i holesterol-vezujuća proteaza

## Klinički značaj elastaze-1

- **Hronična insuficijencija pankreasa**
- Merenje E1 u fecesu je najrealniji i senzitivniji neinvazivni postupak za dijagnozu insuficijencije hroničnog pankreatitisa
- Ovaj test ne može da razdvoji pacijente po težini pankreasne insuficijencije od zdravih osoba
- E1 za razliku od CHY u fecesu ne omogućava praćenje terapije

## Značaj određivanja enzima u fecesu kod praćenja efekta terapije



Tretman pankreasnim enzimima ne utiče na nivo elastaze-1 u fecesu  
Ispitivanja na pacijentima sa cističnom fibrozom i steatorejom

Neinvazivni testovi za ispitivanje egzokrine funkcije pankreasa  
Enzimi u fecesu: himotripsin i elastaza-1  
Osetljivost i specifičnost

**TABLE 51-9** Comparison of Fecal Chymotrypsin and Elastase

	FECAL ENZYME	
	Chymotrypsin	Elastase
10 day intraindividual variation, mean CV	30%	15%
Loss of activity, 7 days at 4 °C	17%	2.5%
Overall diagnostic sensitivity	64%	93%
Overall diagnostic specificity	89%	93%

# *Amilaza*

- *Prisutna u salivi i pankreasnom soku. Može se ekstrahovati iz žlijezda, skeletnih mišića i adipoznog tkiva*
- *Referentne vrijednosti 28–100 U/L*

## *Blago povećane vrijednosti:*

- *Akutni holecistitis*
- *Intestinalna opstrukcija*
- *Zauške*
- *Salivarni kalkulusi*
- *Abdominalne traume*

## *Signifikantno povećanje:*

- *Akutni pankreatitis*
- *Perforacija peptičkog ulkusa*

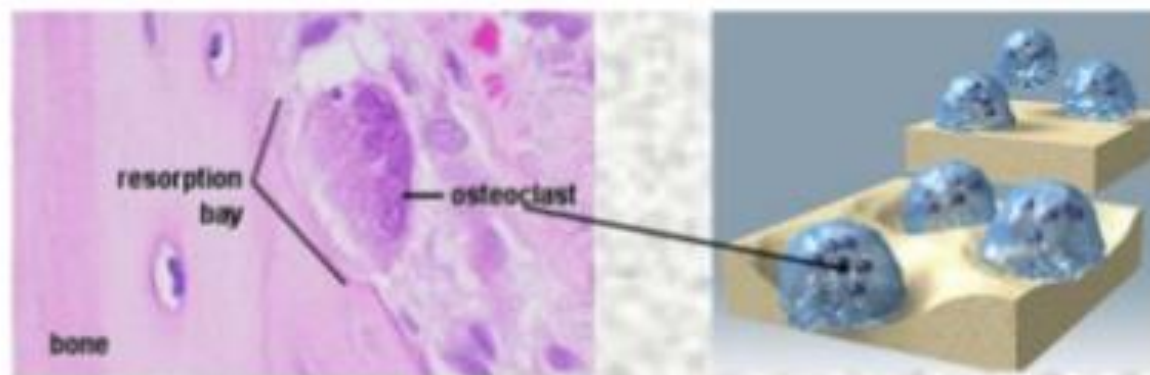
# Kisela fosfataza

## Ćelijska lokalizacija

- Lizosomalna ACP
  - ACP je prisutna u lizozomima, a to su organele prisutne u svim ćelijama izuzev eritrocita.
- Ekstralizosomalna ACP je prisutna u mnogim ćelijama

## Distribucija u tkivima

- Najveća koncentracija ACP je u prostati, kostima (osteoklastima), slezini



## Distribucija kisele fosfataze u krvi

- Eritrociti, trombociti i leukociti



## Izoenzimi i izoforme kisele fosfataze

Pet tipova kisele fosfataze (4 izoenzima)

### Elektroforetska pokretljivost na PAAG

1. Lizosomalna LAP **tip 3**
  - Mast ćelije
2. Prostatična kisela fosfataza PACP **tip 2b**
  - Prostata, mozak, slezina, jetra, trombociti
3. Eritrocitna EACP **tip 1**
  - Eritrociti
4. A. Makrofagna MACP **tip 5a**
  - Makrofage jetre, slezine i pluća

B. Osteoklastna OsACP **tip 5b**

  - Osteoklasti kostiju

# Svojstva kisele fosfataze

- Stabilnost kisele fosfataze – nestabilna
  - Na temperaturi preko 37°C
  - Nestabilna u alkalnoj sredini, pH >7,0
  - Neke forme u serumu su labilne i više od 30 % ACP aktivnosti se gubi tokom 3 sata na sobnoj temperaturi
  - Acidifikacija seruma na pH ispod 6,5 pomaže u stabilizaciji enzimske aktivnosti.
- Uticaj jona, aktivatora i inhibitora
  - Na aktivnost ne utiču joni Mg<sup>2+</sup> i Zn<sup>2+</sup>.
  - Aktivnost ACP stimulišu hidroksilna jedinjenja - akceptori fosfata
  - Izoenzimi ACP se međusobno razlikuju i po osetljivosti prema inhibitorima kao što su etanol, formaldehid, L-(+)-tartarat, gvožđe, bakar i fluorid.



# Izoenzimi kisele fosfataze

## Lizosomalna kiselna fosfataza

- Deficijencija LACP
- Autozomalno recesivno oboljenje
- Poremećaji u metabolizmu

## Prostatična kiselna fosfataza

- Serumski marker kancera prostate
- U semenoj tečnosti
- Marker u forenzici za seksualne delikte
- Ranije se prostatična ili tartarat osetljiva kiselna fosfataza koristila za praćenje karcinoma prostate ali sada je u potpunosti zamenjena sa prostata- specifičnim antigenom (PSA).
- Novija ispitivanja prognostičkog značaja PACP
- Vrednosti su višestruko povećane kod karcinoma prostate

## Eritrocitna kiselna fosfataza

- EACP pokazuje genetski polimorfizam
- Utvrđivanje očinstva
- Poremećaj hemolitički favizam



## Klinički značaj tartarat rezistentne kisele fosfataze

Blaga ili umerena povećanja serumske TR-ACP

1. Pagetova bolest
2. Hiperparatiroidizam sa manifestacijama na kostima
3. Malignim invazijama na kostima pri kanceru dojke kod žena
4. Osteoklastoma tumor giant ćelija - osteoklastna neoplazma
5. Osteopetrosis – mermerna bolest kostiju gde osteoklasti ne mogu da resorbuju kost

# Kisela fosfataza u Pagetovoj bolesti

Među bolestima kostiju umeren porast se dobija kod Pagetove bolesti (osteitis deformans)

Rezultat dejstva osteoklastnih ćelija  
Povećana aktivnost u prvoj fazi, ali specifičnije je povećanje ALP

Rentgenski snimak

Osteolitička mesta na delu osteoklastne resorpcije kostiju

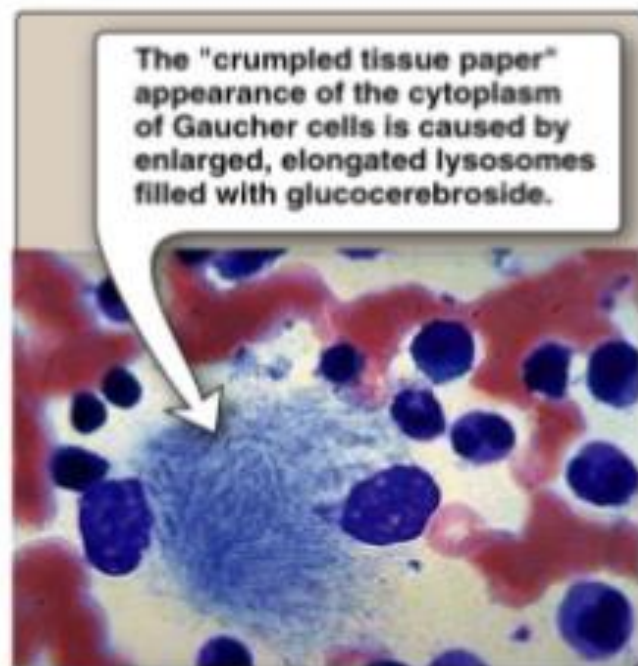
Sklerotična mesta na delu aktivnosti osteoblasta



## Makrofagna kisela fosfataza Tartarat rezistentna kisela fosfataza tip 5a

- **Gaucher-ova bolest**
- Poremećaj metabolizma glukocerebrozida
- Recesivno oboljenje
- Deponovanje lipida u mozgu i kostima
- Mentalna retardacija
- Gaucher-ove ćelije –
  - makrofagne abnormalne ćelije
  - identifikacija ćelija citohemijsko bojenje
- Demineralizacija kostiju

Ćelije kostne srži:  
Gaucherove ćelije sa deponovanim  
Glukocerebrozidima u lizozomima  
duguljastog izgleda



The "crumpled tissue paper" appearance of the cytoplasm of Gaucher cells is caused by enlarged, elongated lysosomes filled with glucocerebroside.

Figure 17.19  
Aspirated bone marrow cells from patient with Gaucher disease.