

# ***ENZIMI OD KLINIČKOG ZNAČAJA***

**18. – 21.XII.2018.**

---

## 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 enzimске 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

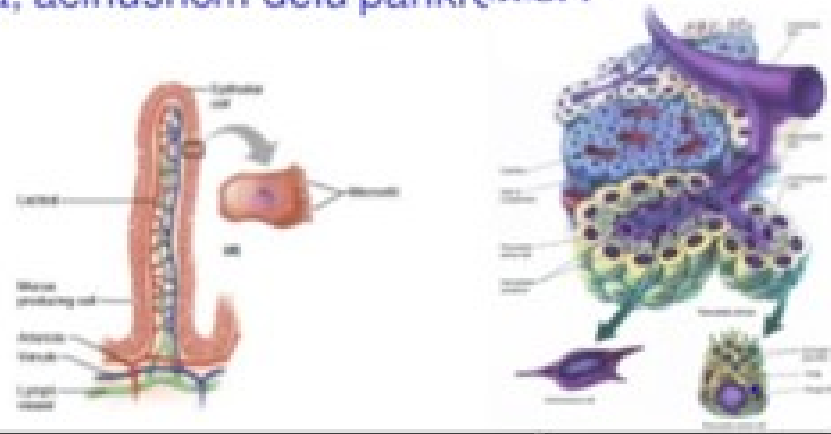
# 1. Sekretorni enzimi

## 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

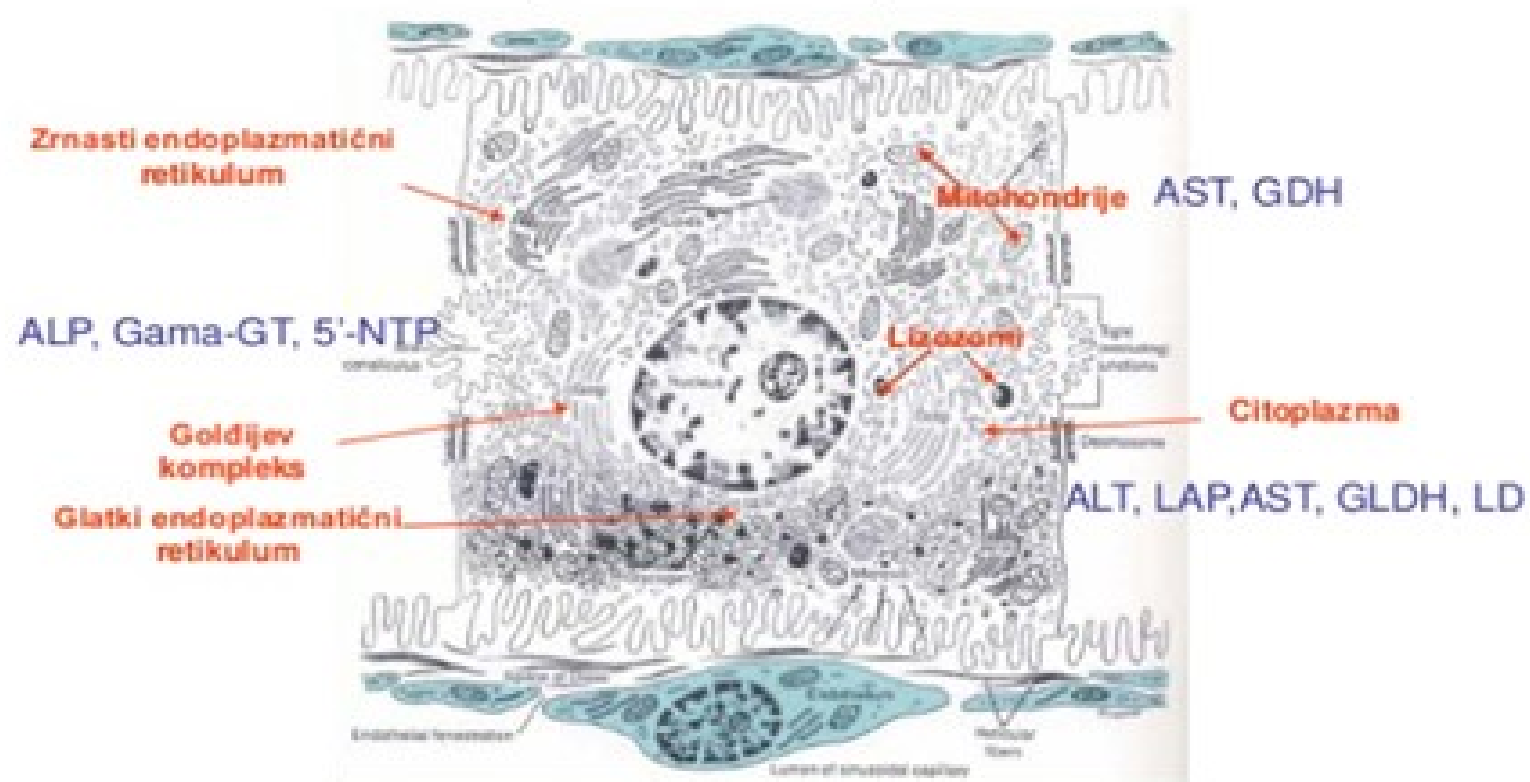
## B. Ekskretorni enzimi

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



## 2. Intracelularni enzimi

### Lokalizacija enzima u hepatocitima

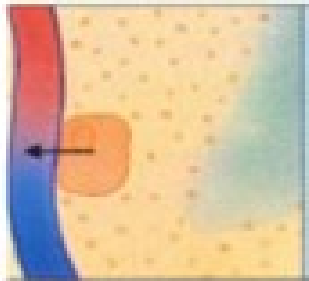


## Efluks enzima iz oštećenih ćelija u cirkulaciju

- 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

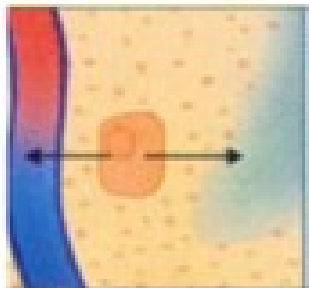
## Efluks enzima iz oštećenih ćelija u cirkulaciju

### Putevi ulaska enzima u cirkulaciju



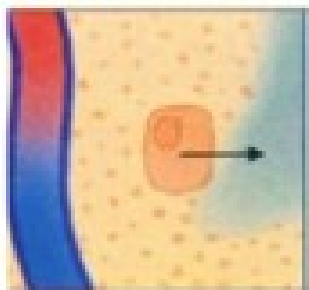
Vrlo permeabilna  
Bazalna membrana  
Ćelije blizu kapilara

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

Uticaj sinteze enzima i brzine uklanjanja iz cirkulacije

GGT - ektoenzim



## Promene u sintezi enzima

- Normalno : minimalne količine intracelularnih enzima u plazmi zbog oslobađanja enzima u plazmu
- Smanjeno oslobađanje enzima zbog smanjene sinteze enzima
  - Genetski defekt u sintezi enzima
  - Hipofosfatemija na alkalnu fosfatazu
  - Nulti ili silent alel kod serumske holinesteraze
- Povećana sinteza enzima
  - Veći klinički značaj
  - Povećanje broja i aktivnosti osteoblasta
  - Kod dece u periodu rasta i kod bolesti kostiju
- Indukcija sinteze enzima
  - Gama-GT prilikom uzimanja lekova
    - barbiturata i fenitoina
    - alkohola

# Eliminacija enzima iz cirkulacije

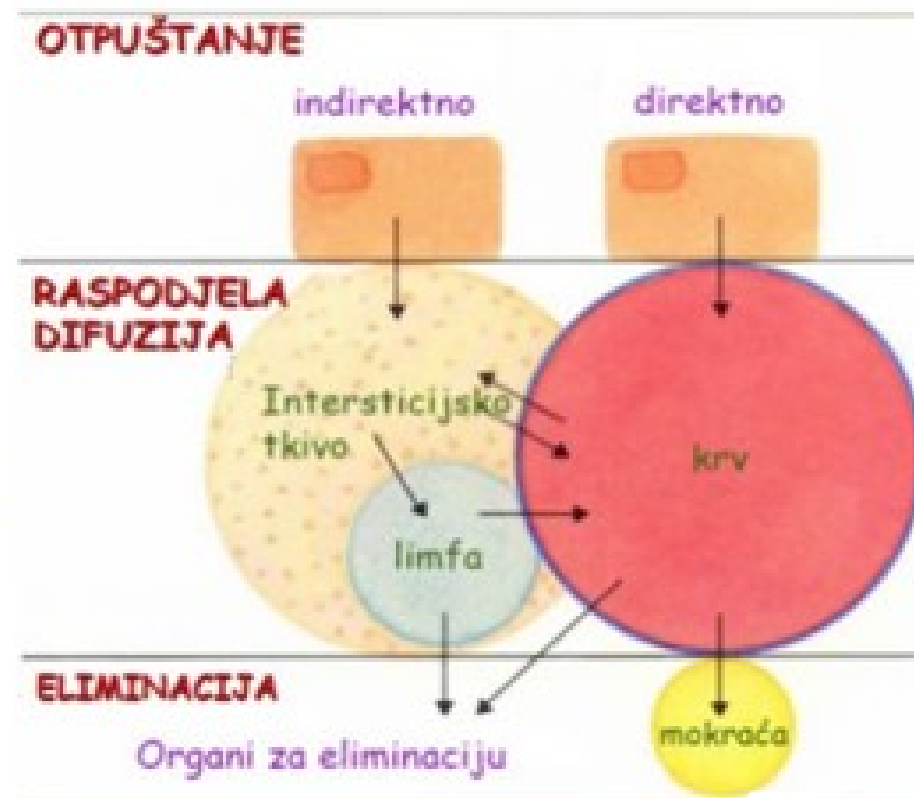
Klirens enzima putem:

1. Urina (amilaza)

2. RES

košna 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

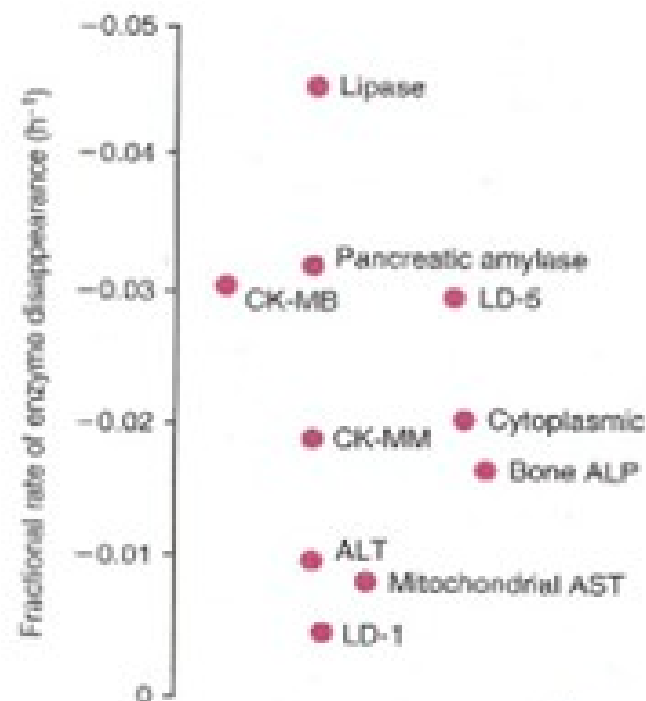
## Poluživot enzima



- 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

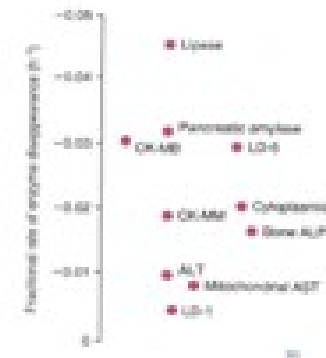
## Poluživot enzima



- Poluživot enzima varira:
- Od nekoliko sata do nekoliko dana
- Prosečno (1/2 od 6 do 48 sati)

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

Frakciona brzina uklonjanja (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

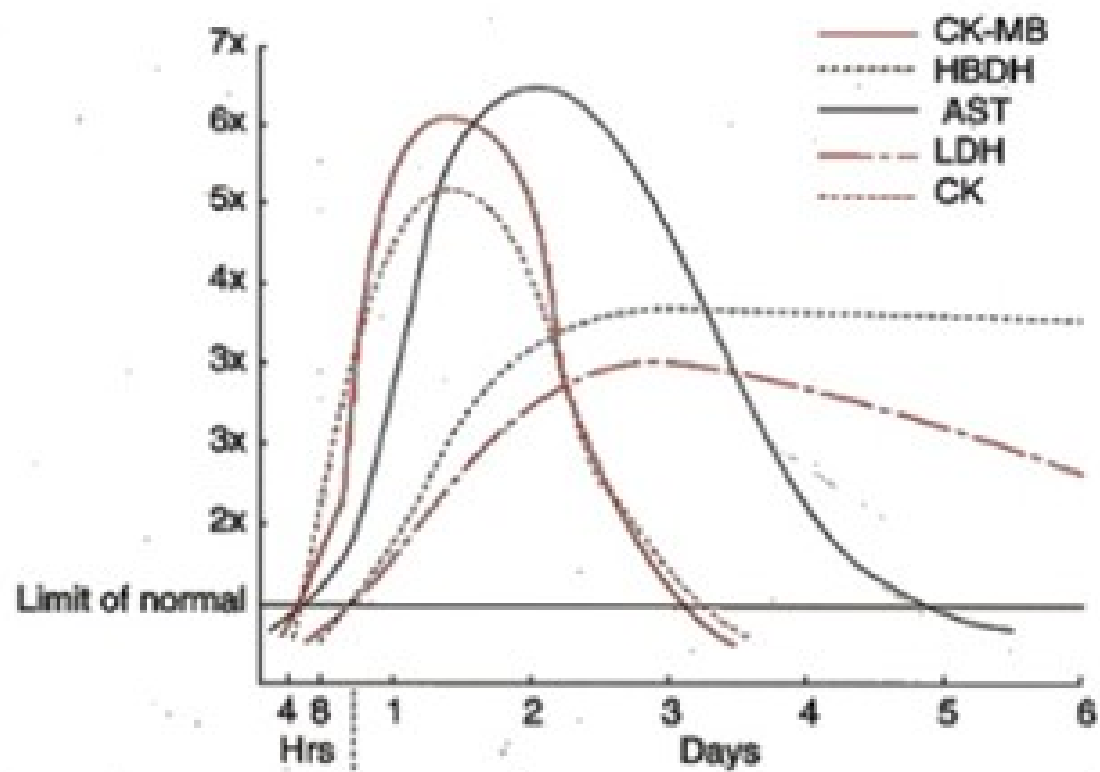
ALP  
AcP

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

Dinamika promena enzima u akutnom infarktu miokarda

Dijagnostički prozor enzima

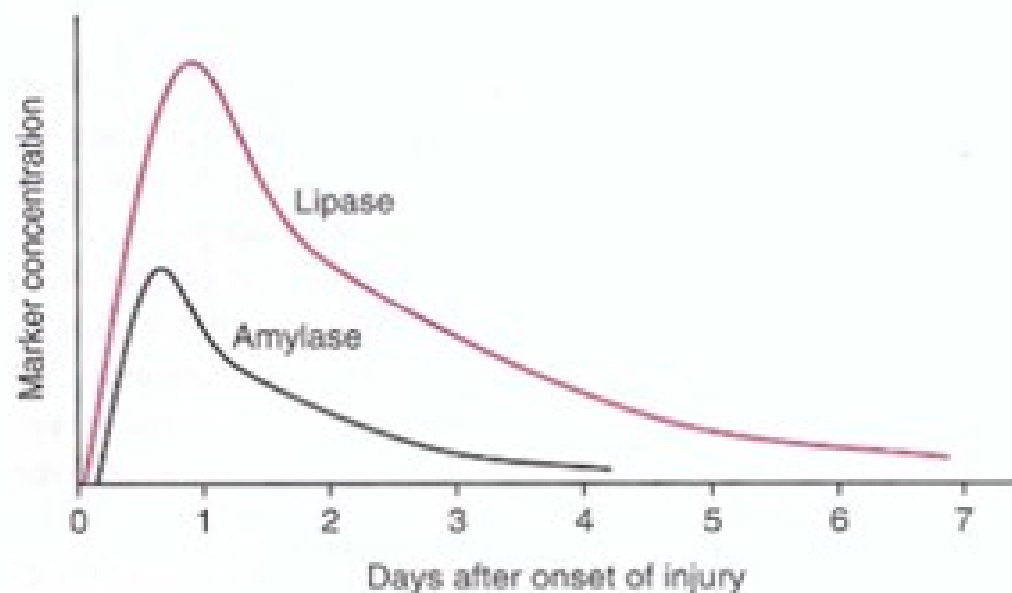
Rani i kasni markeri





#### 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

## 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

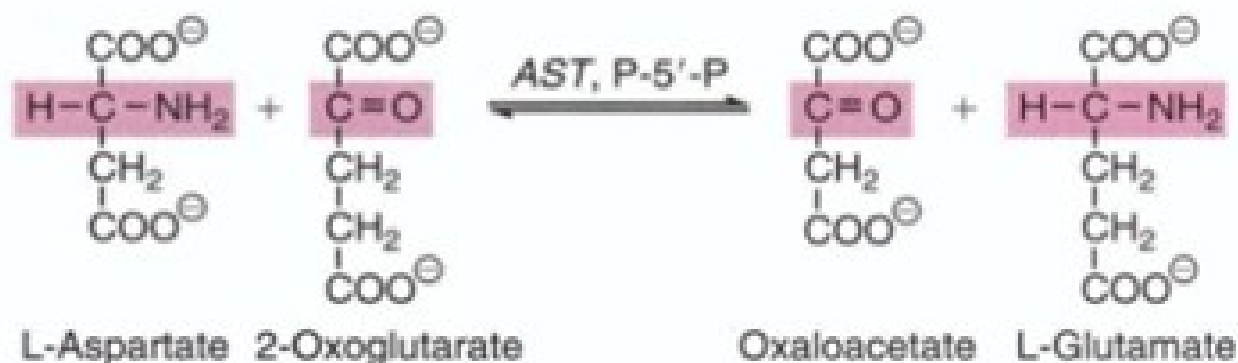
## Alanin aminotransferaza, ALT (ALAT)

- 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

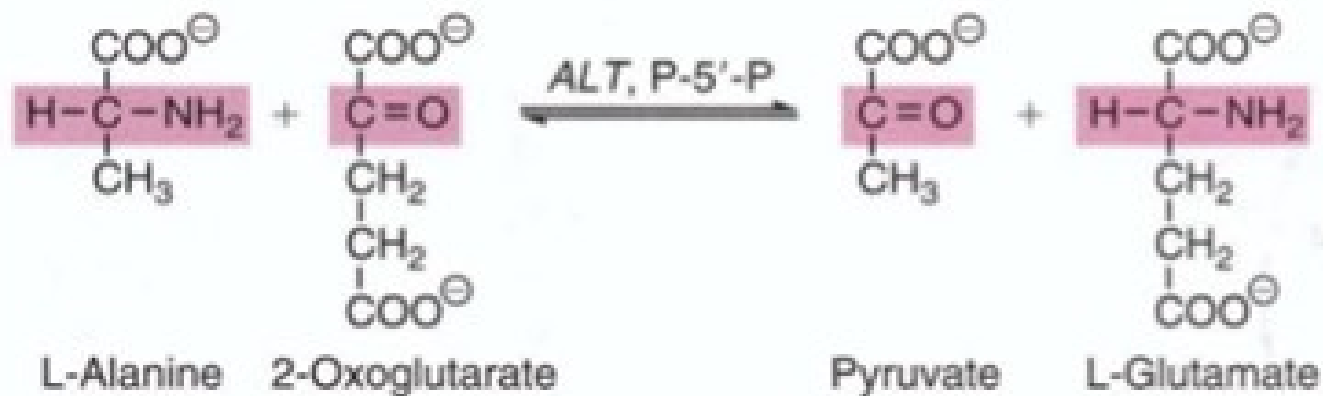
- Par 2-oksoglutarat/L-glutamat ili 2-ketoglutarat/L-glutamat služi kao akceptor amino grupe i kao donor u svim reakcijama transfera aminogrupe
- Specifičnost pojedinačnog enzima proističe iz specifične aminokiseline koja služi kao donor amino grupe

AST katalizuje sledeću reakciju



# Aminotransferaze

ALT katalizuje sledeću reakciju

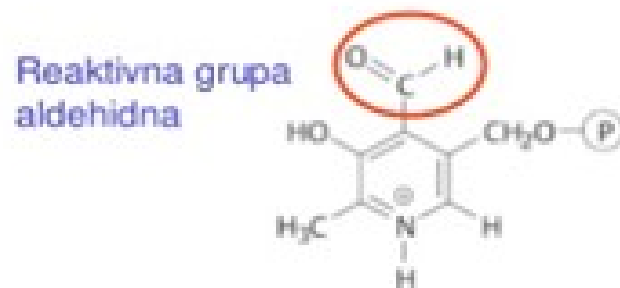


Reverzibilne reakcije

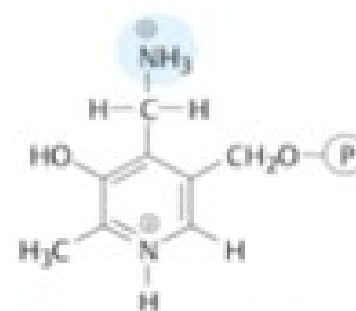
Ravnoteža je više pomerenka stvaranju aspartata i alanina

# 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.



Piridoksal-5'-fosfat



Piridoksamin-5'-fosfat

# Mehanizam transaminacije

## Prva faza- konvertovanje aminokiseline u keto kiselinu (PLP → PMP)

1. Nukleofilna aminogrupa aminokiseline napada ugljenikov atom Šifove baze enzim-PLP (aldimin), uz oslobađanje amino grupe lizina enzima. Lizin je sada slobodan i deluje kao važna baza aktivnog centra.
2. Šifova baza aminokiseline-PLP tautomerizuje se u Šifovu bazu  $\alpha$ -ketokiseline-PMP (ketimin) pomoću lizina aktivnog centra uklanjanjem  $\alpha$ -vodonika aminokiseline i protonacije atoma C4' PLP-a putem rezonantno stabilizovanog karbanjonskog intermedijera. Ova rezonantna stabilnost olakšava raskidanje C  $\alpha$ -H veze.
3. Šifova baza  $\alpha$ -ketokiseline-PMP se hidrolizuje do PMP i  $\alpha$ -ketokiseline.

## Druga faza –konvertovanje $\alpha$ -keto kiseline u aminokiselinu



3. PMP reaguje sa  $\alpha$ -ketokiselinom i gradi se Šifova baza
2. Šifova baza  $\alpha$ -ketokiseline-PMP tautomerizuje i gradi se Šifova baza aminokiseline-PLP
1.  $\alpha$ -aminogrupa lizina aktivnog centra reaguje sa Šifovom bazom aminokiselinom-PLP i u reakciji transaminacije kako bi se regenerisao aktivni enzim-Šifova baza i oslobađa se nova aminokiselina.

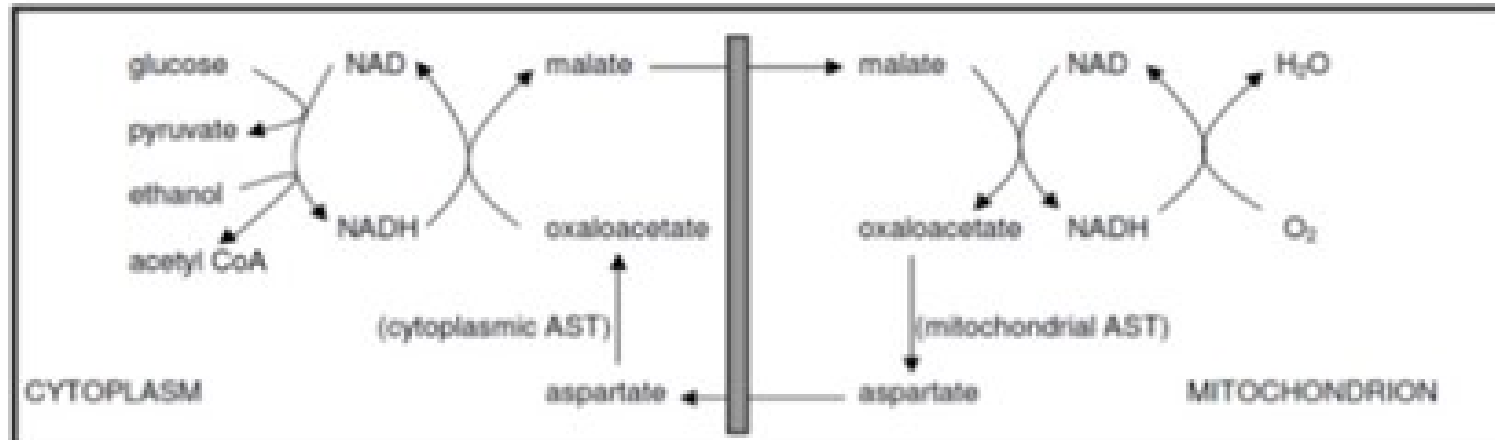


# Aminotransferaze

- U serumu mogu biti prisutne obe forme:
- Koenzim-deficijentan apoenzim i holoenzim
- Dodatak P-5'-P pod uslovima kada je moguća rekombinacija sa enzimom obično dovodi do povećane aminotransferazne aktivnosti
- U skladu sa preporukama o optimizaciji svih faktora koji deluju na brzinu enzimske reakcije, IFCC preporučuje dodavanje P-5'-P u metodama za određivanje aminotransferaza kako bi se odredila sva prisutna aktivnost transaminaza u serumu.

## 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

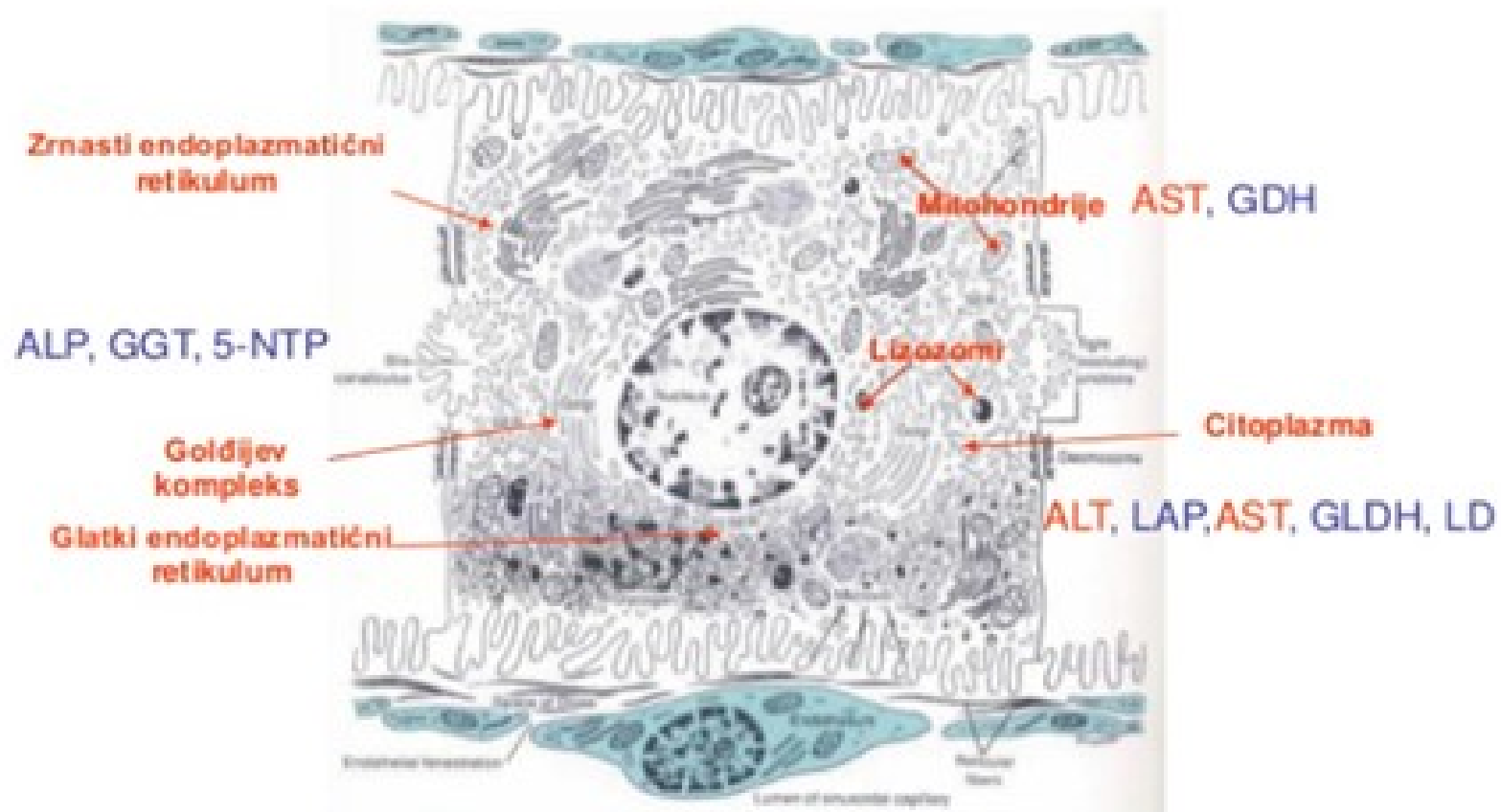
## Ćelijska lokalizacija:

- 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.

## Lokalizacija enzima u hepatocitima



## 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

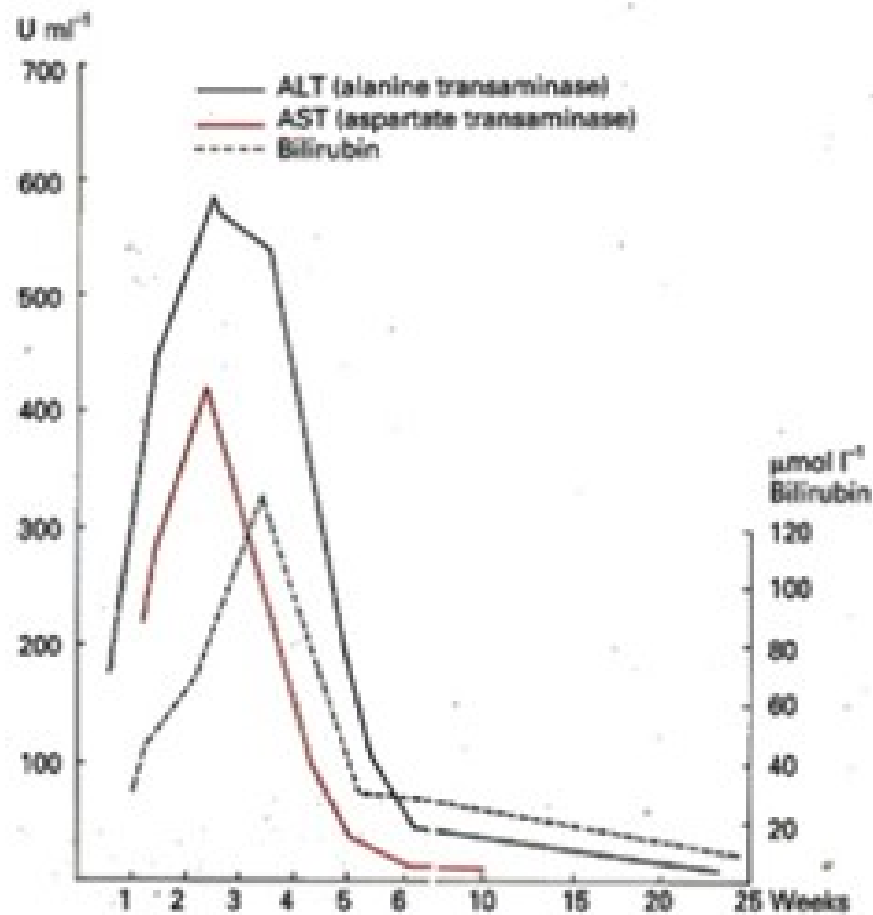
### Dinamika enzimskih promena aktivnosti

- 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 hepatičnog 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

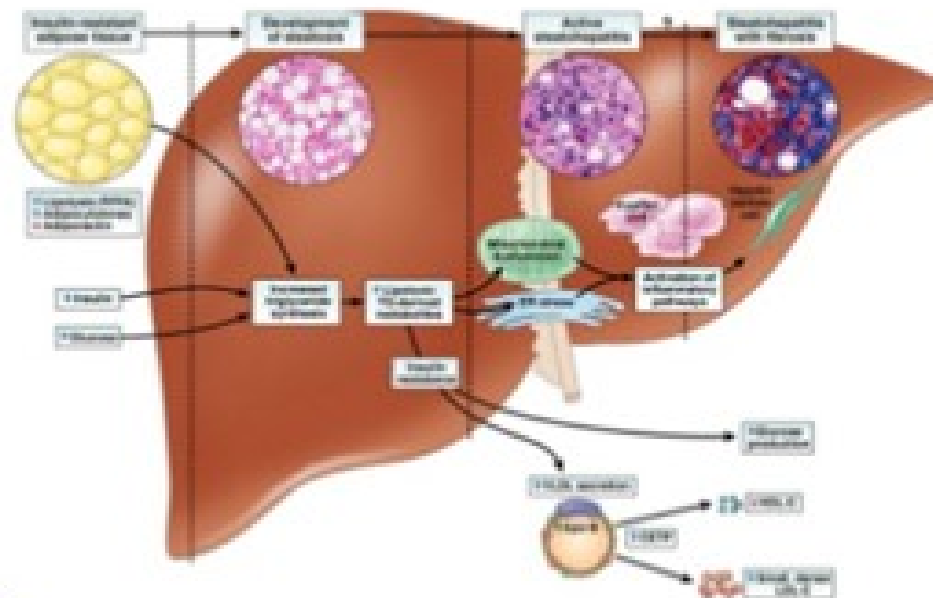
### Nealkoholna masna jetra

### 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

- Dobile 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 antiinflamatorni 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, autoimuni hepatitis, primarna bilijarna ciroza, sklerozirajući holangitis i deficijencija alfa-1-antitripsina.

# Klinički značaj transaminaza

## Karcinomi

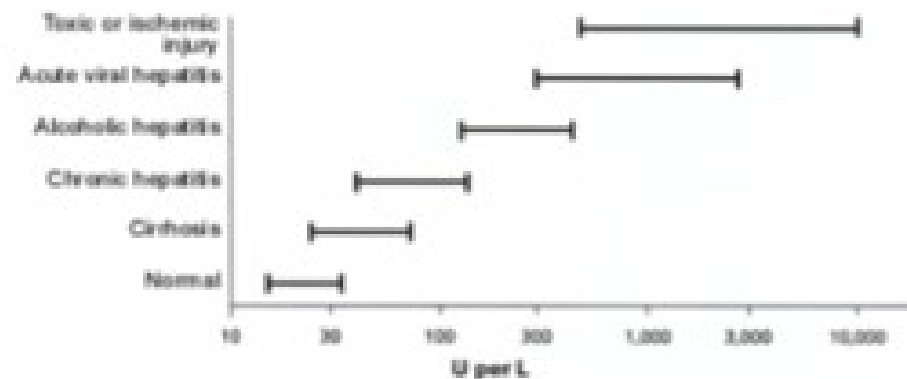
- Povećanje od 2 do 5 puta oba ova enzima se javlja kod pacijenata sa primarnim karcinomom jetre ili sa metastazama karcinoma na jetri
- Obično je AST viši od ALT
- Vrednosti su obično normalne u ranim stadijumima maligne infiltracije jetre

## 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

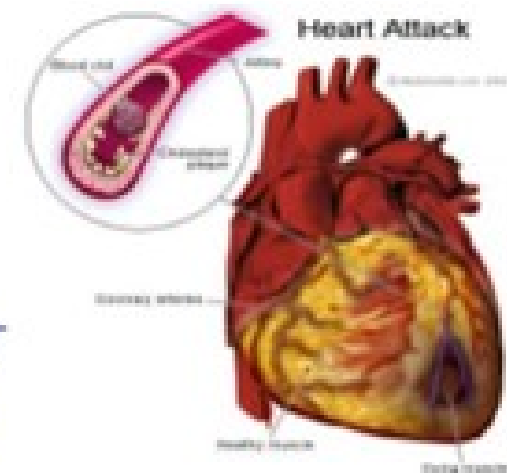
- Posle akutnog infarkta miokarda, povišene aktivnosti AST u serumu zbog visokih aktivnosti AST u srčanom mišiću

### 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

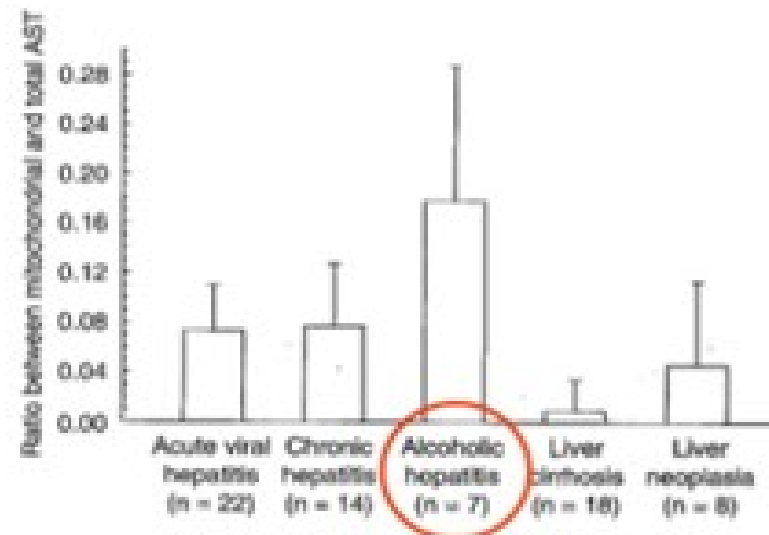
### Druge bolesti

- 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***

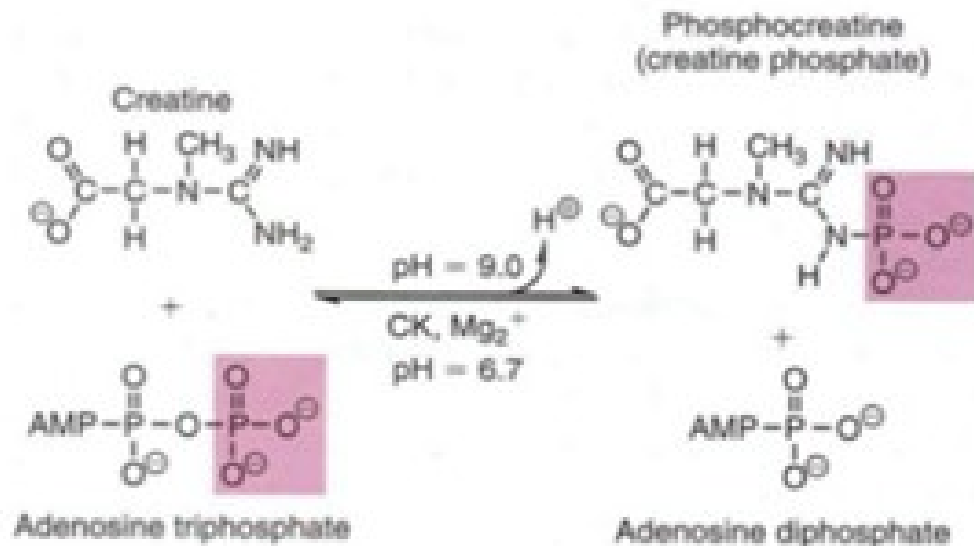
***KREATIN KINAZA***

## Kreatin kinaza

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



## Kreatin kinaza



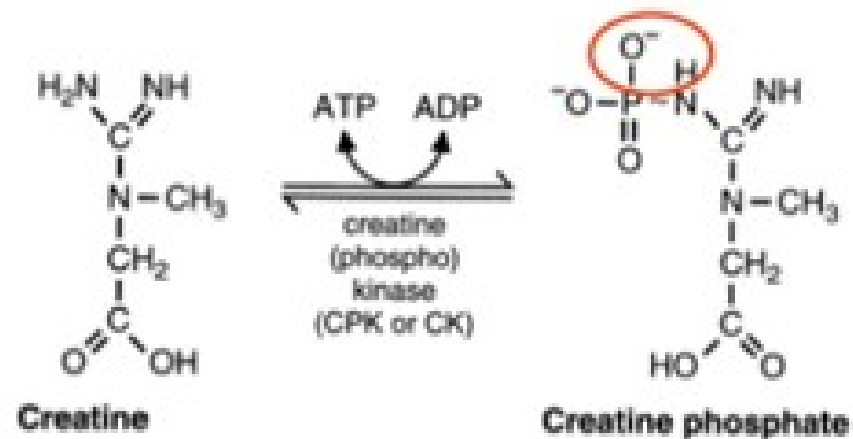
### Uticaj pH

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 puler 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: citoplazmatska i mitohondrijska

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

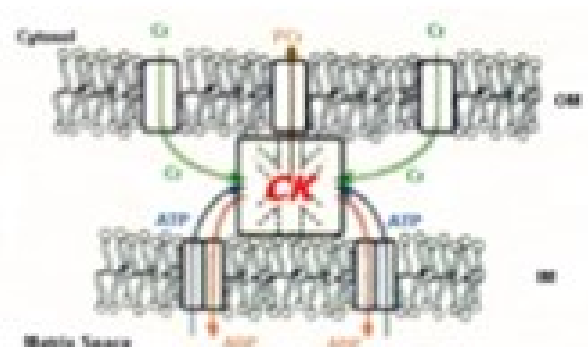
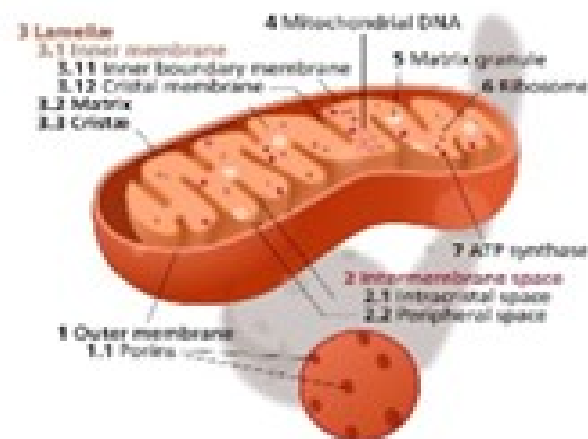
Relativne aktivnosti pojedinih citozolnih izoenzima CK u tkivima

**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

## Mitohondrijalna kreatin kinaza

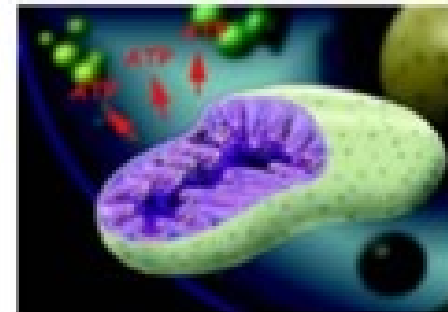
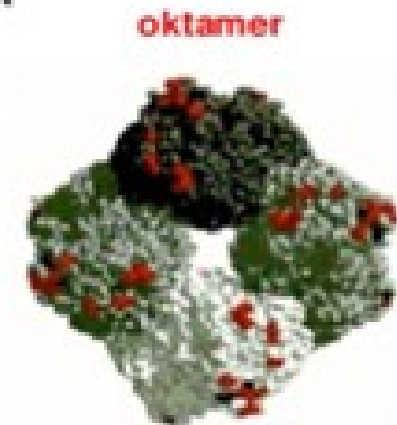
- Pored ovih citozolnih postoji i četvrti izoenzim
- Razlikuje se imunološki i na osnovu elektroforetske pokretljivosti
- CK-Mt izoenzim je lociran između unutrašnje i spoljašnje membrane mitohondrija
- U srcu on čini 15% od ukupne CK aktivnosti
- Dve forme mitCK
- **Sarkomerna**
- **Ubihinonska**



# 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



# 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, sulfati, 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

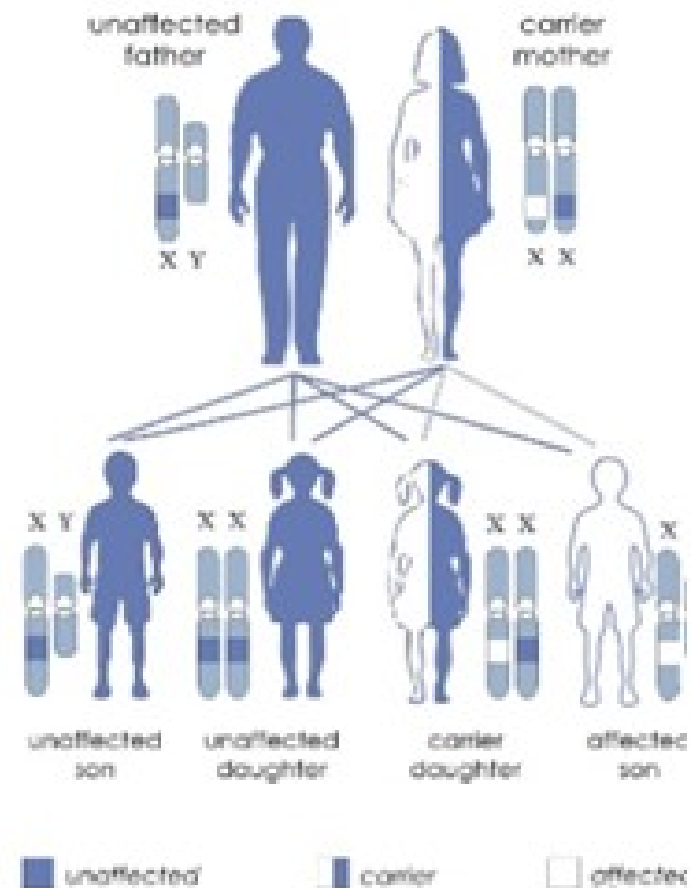
Vrednosti CK vrlo visoke kod obolelih  
Bolest vezana za pol

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

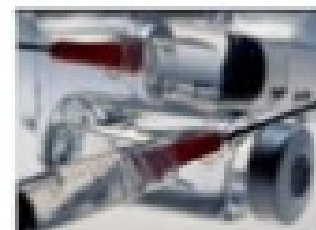
### Mišićne bolesti

- 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.

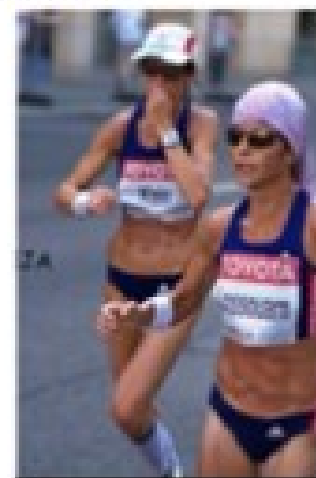
# Klinički značaj CK

## 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 mišićni 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 hipolipidemike ?**
  - 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

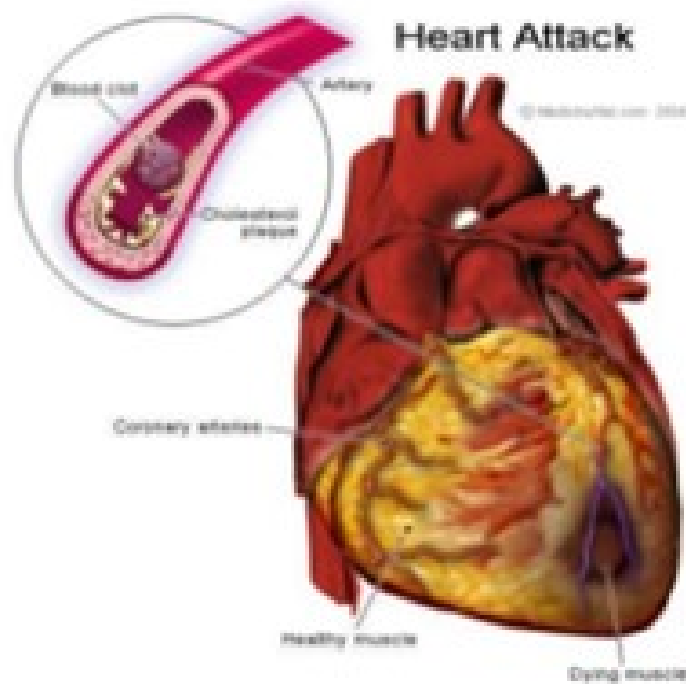
- Aktivnost CK u serumu pokazuje inverznu povezanost sa funkcijom tiroideje
- Oko 60 % pacijenata sa hipotiroidizmom pokazuje prosečno povećanje CK od pet puta u odnosu na gornju granicu referentnih vrednosti
- Povećanje može biti i mnogo veće
- Glavni izoenzim koji se povećava je CK-MM, što ukazuje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



## Klinički značaj CK i CK-BB

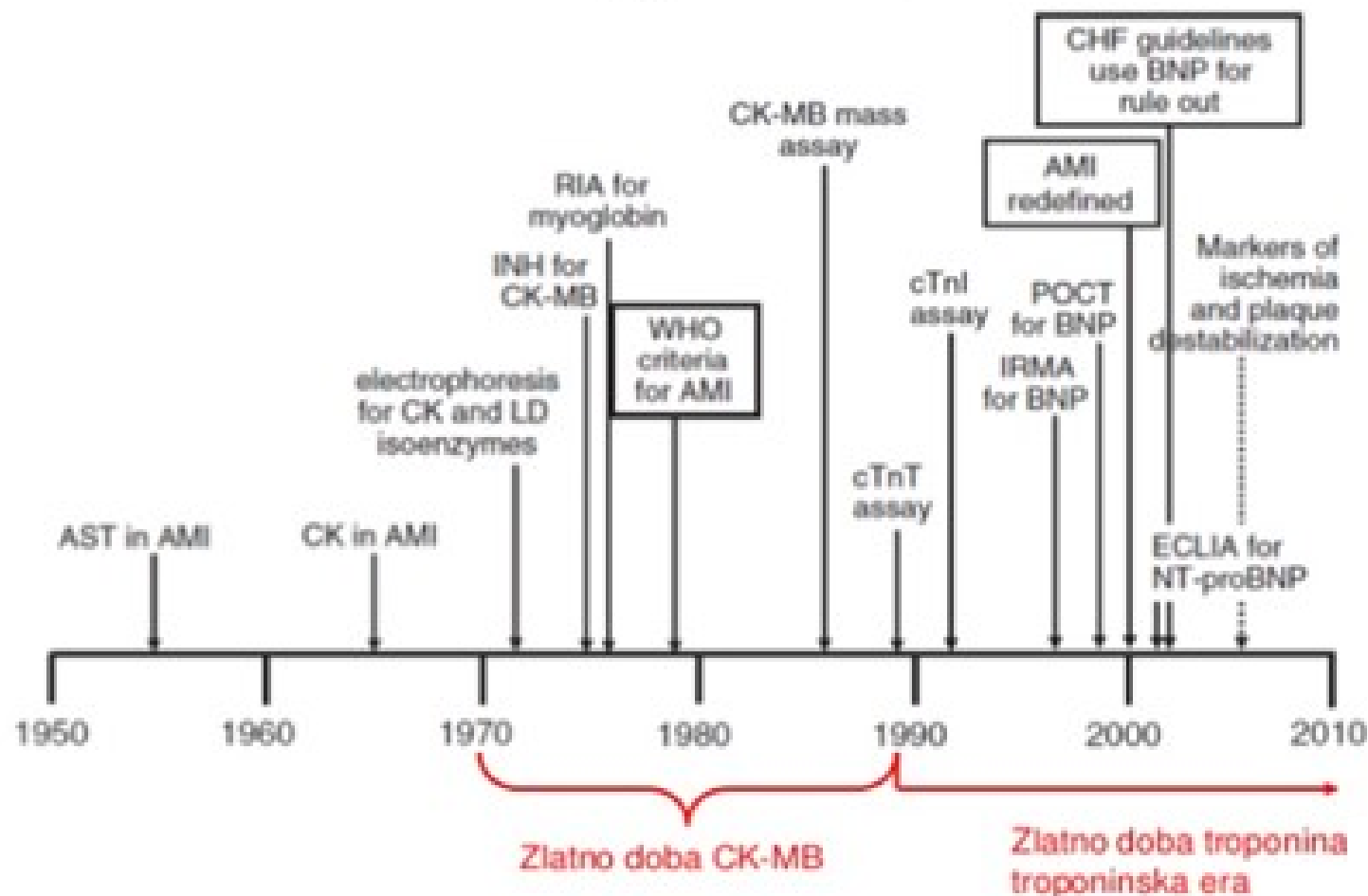
- U toku **porođaja** povećava se serumska CK kod majke i do 6 puta.
- Ukoliko je porođaj praćen i nekom **hirurškom intervencijom** povećanje je mnogo veće
- CK-BB može biti povećan kod beba, ako je **mozak oštećen** ili ako je mala težina novorođenčadi
- Pojava CK-BB u krvi u niskoj koncentraciji,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

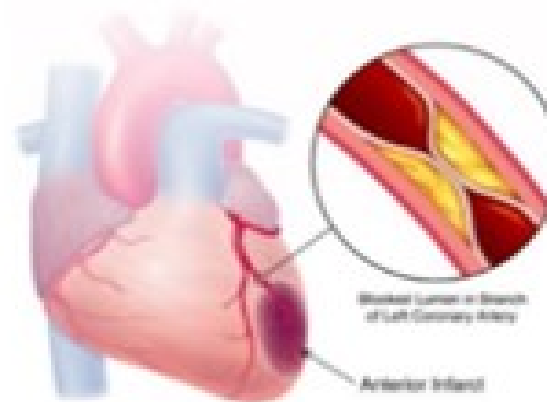
### II aktivnost izoenzima CK-MB

- 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

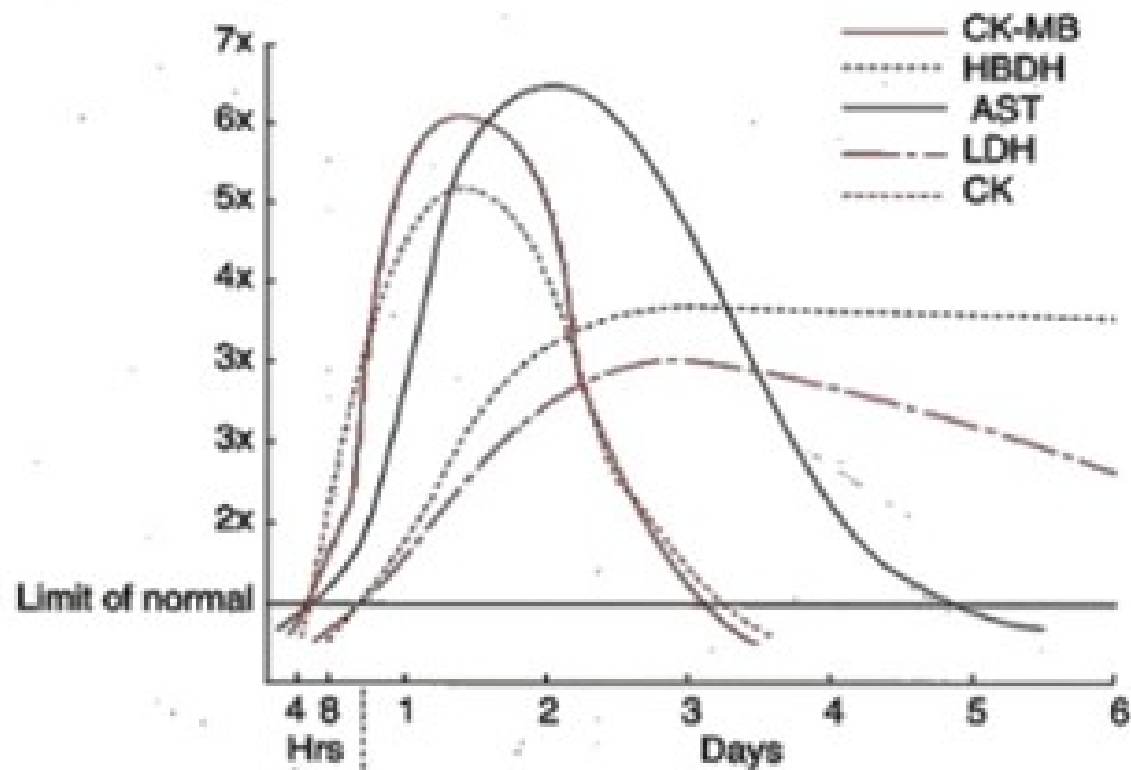


## Karakteristike CK MB kao biomarkera akutnog koronarnog sindroma

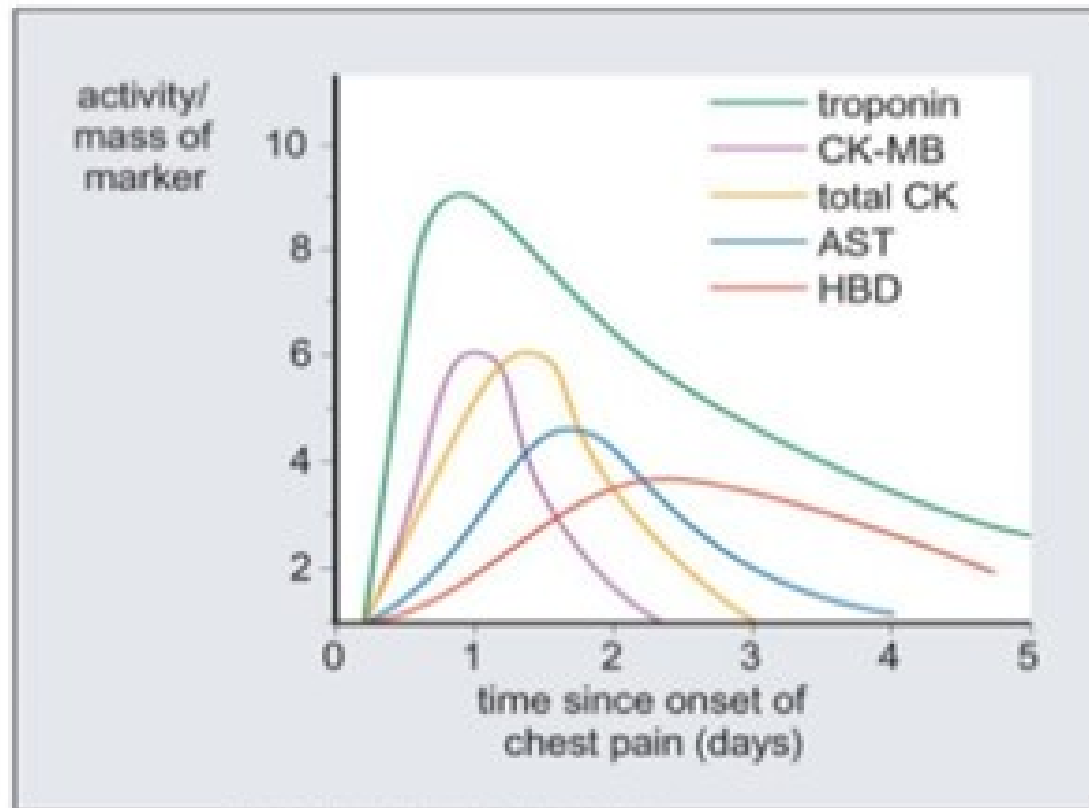
- Rani marker infarkta miokarda
- Oslobađanje 3-6 h posle pojave bola
- Maksimum oko 24 h
- Normalizacija 24-72 h
- Specifičan biomarker

# Dinamika promena enzima u akutnom infarktu miokarda

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



## Dinamika promena enzima u akutnom infarktu miokarda Troponinska era

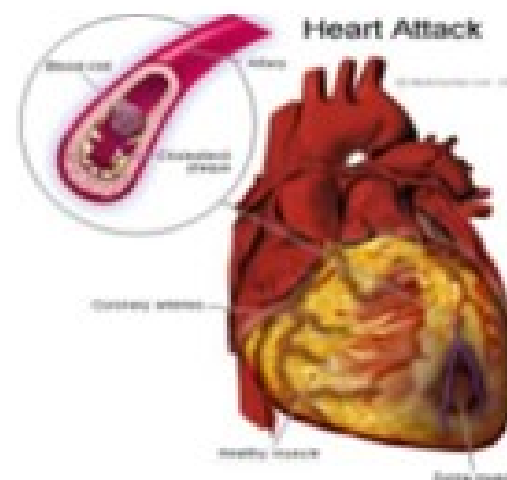


Marshall & Renwick: Clinical Chemistry, 6th Edition.  
Copyright © 2008 by Mosby, an imprint of Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Zaključci:

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

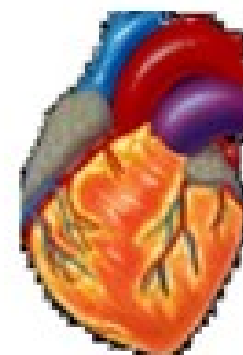
- Promene u CK i CK-MB izoenzimu posle akutnog infarkta miokarda bili su glavni testovi u dijagnostici mnogo godina.
- Sada se koriste mnogo kardio-specifičniji neenzimski markeri (citozolni proteini) kao što su troponin I i troponin T.
- **CK-MB masa se još uvek može koristiti uspešno za procenu širine miokardijalne nekroze i za procenu prognoze infarkta.**
- Kada se upoređi 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 veliĉine infarkta

- Mikroskopski infarkt miokarda < 10 µg/L
  - Fokalna nekroza
- Mali infarkt miokarda 10-60 µg/L
  - <10 % leve ventrikule
- Srednja veliĉina 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

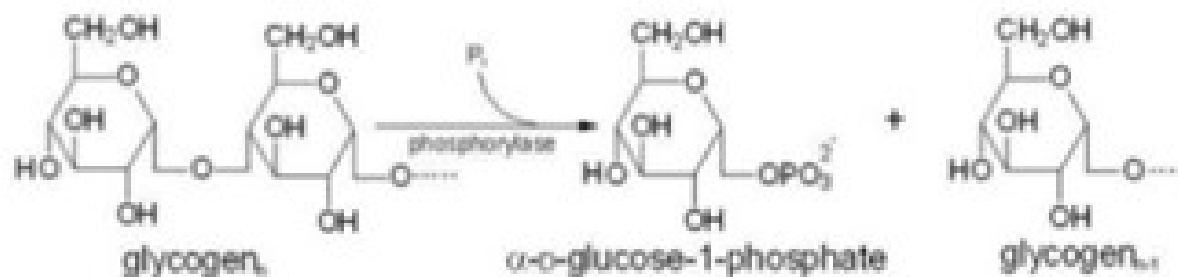
- kardiopulmonalni bypass
- koronarni arterijski bypass
- transplantacija srca
- miokarditis
- perikarditis
- pulmonalni embolizam

## Mišićni enzimi

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

# Glikogen fosforilaza

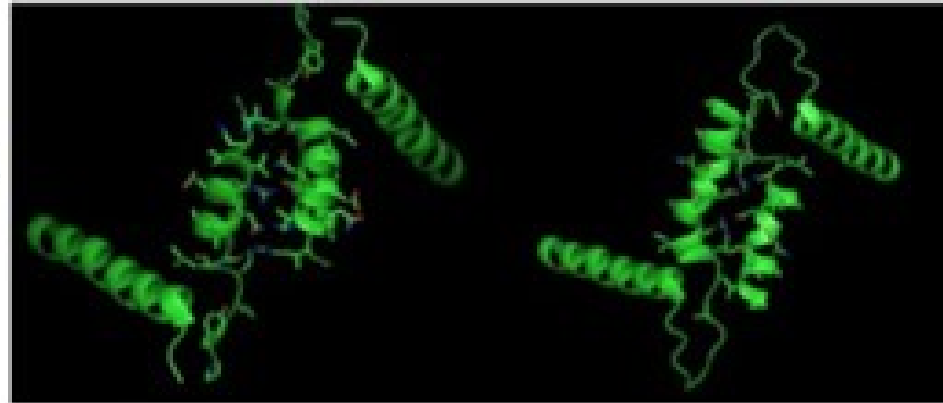
- EC 2.4.1.1;
- 1,4-alfa-D-glukan: ortofosfat alfa-D-glikoziltransferaza;
- Skraćenica GP
- Igra ključnu ulogu u metabolizmu ugljenih hidrata jer mobilizuje glikogen
- Katalizuje prvu reakciju u glikogenolizi u kojoj se glikogen prevodi u glukozu-1-fosfat





# Glikogen fosforilaza

R i T stanje glikogen fosforilaze



## Struktura i izoenzimi GP

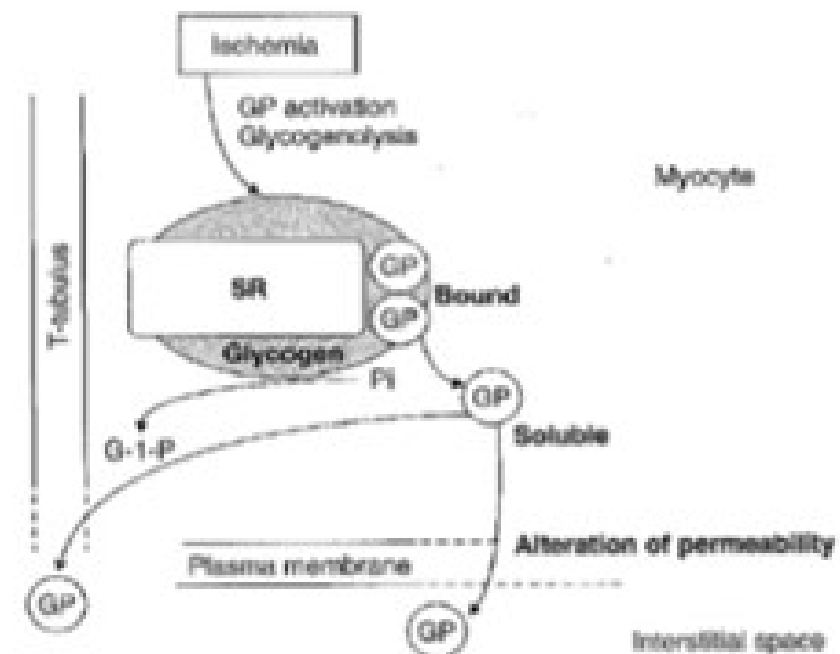
- GP postoji kao dimer i sastoji se iz dve identične subjedinice
- U humanom organizmu postoje tri izoenzima:
- GP-LL, GP-MM i GP-BB.

## 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

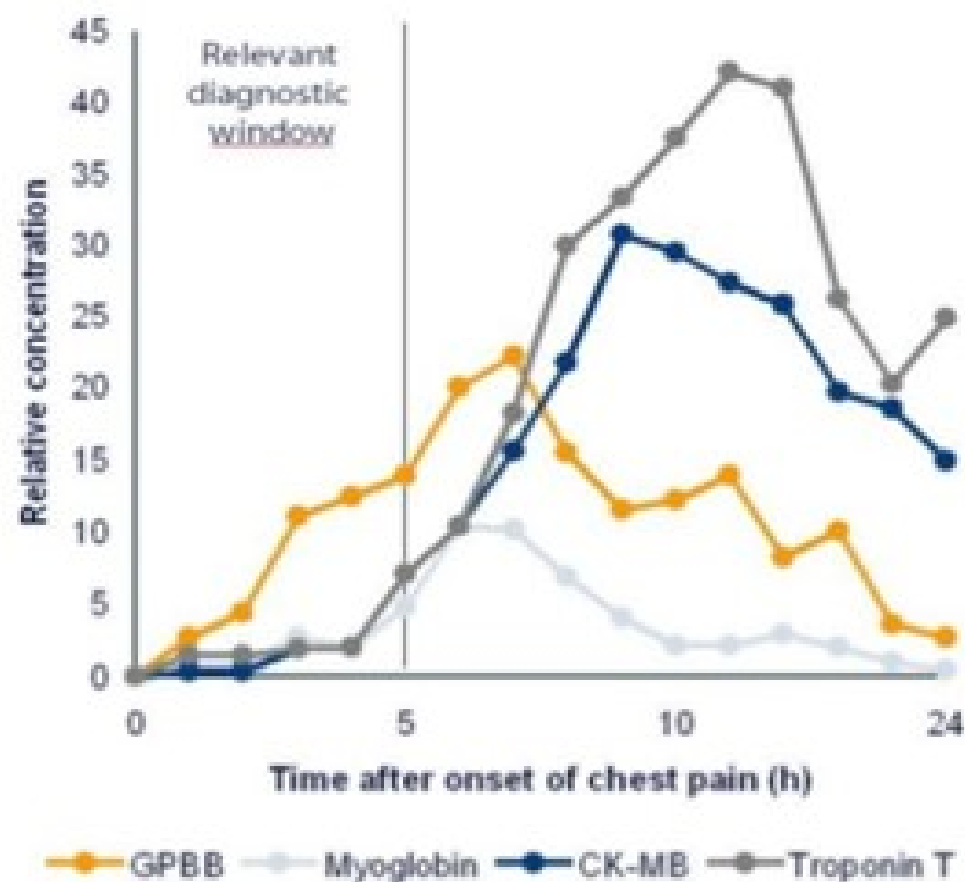


Kada dođe do tkivne hipoksije, glikogen se razlaže i nestaje, GP postaje rastvorljiv i može da se pomera sa odeljka peri-sarkoplazmatičnog retikuluma direktno u ekstracelularnu tečnost

## 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**

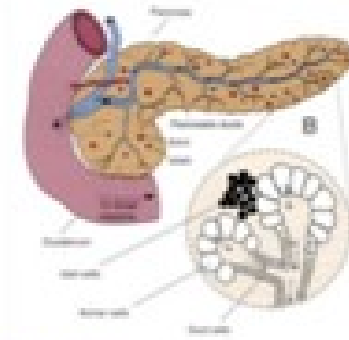


# ***PROTEOLITIČKI ENZIMI***

*PROTEOLITIČKI ENZIMI*

## Pankreasni enzimi

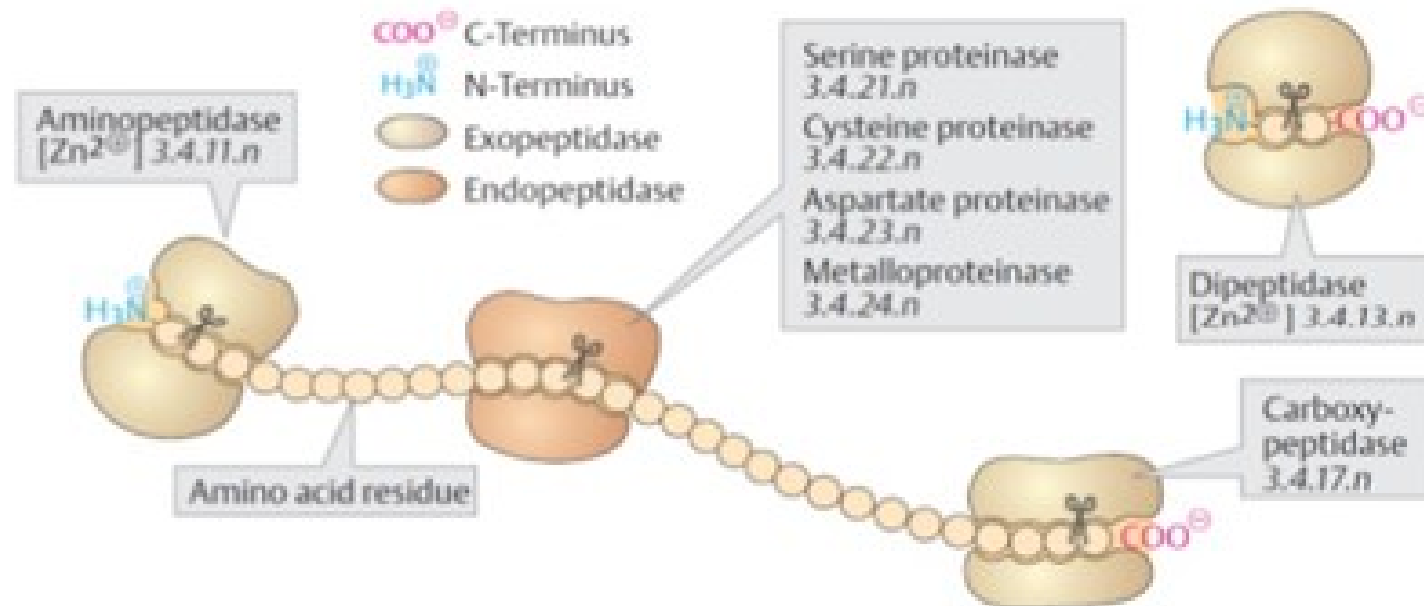
- Amilaza
- Lipaza
- **Proteolitički enzimi** - zimogeni enzimi
  - Tripsin
  - Himotripsin
  - Elastaza



# 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

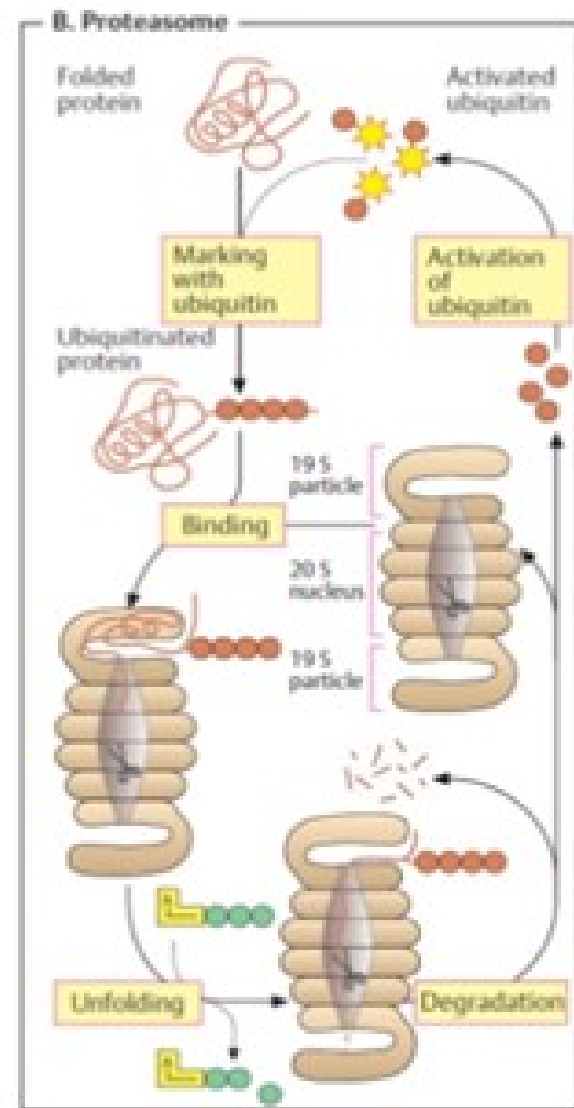
1. Intracelularni
2. Sekretorni



# 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

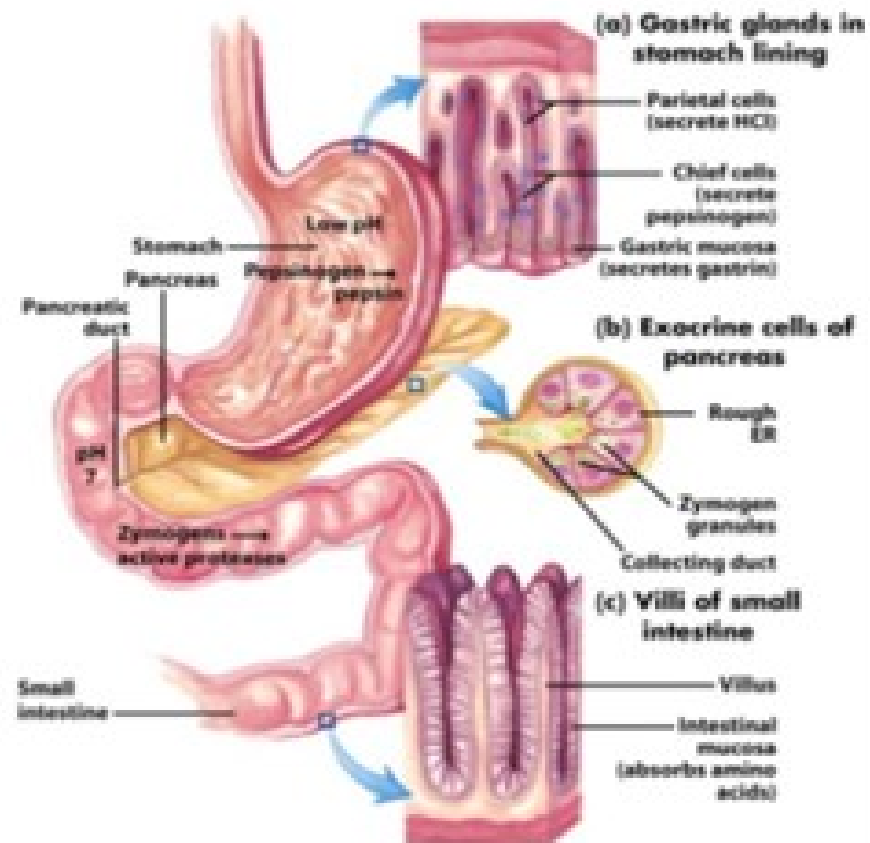
Karboksipeptidaze A i B

Varenje u tankom crevu

Endopeptidaze

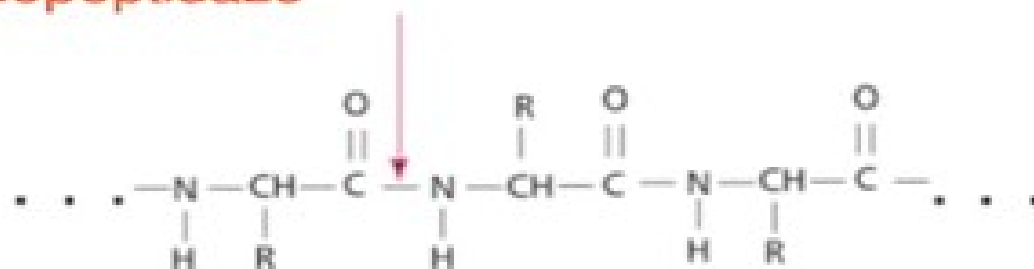
Aminopeptidaze

Dipeptidaze



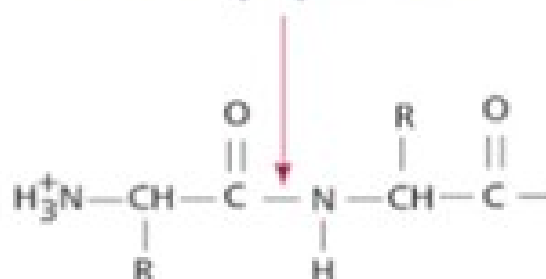
# Varenje proteina: enzimi

- Endopeptidaze

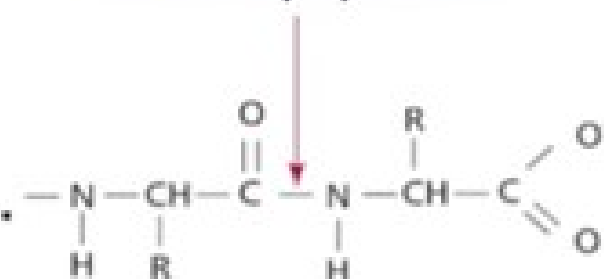


- Egzopeptidaze

Aminopeptidaze

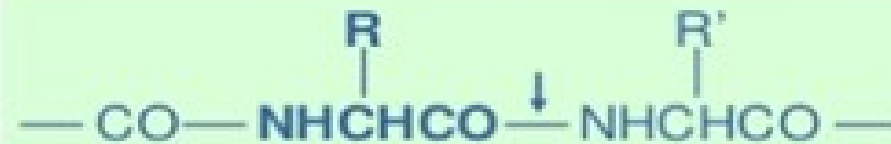


Karboksipeptidaze



# Varenje u želucu: Pepsini

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

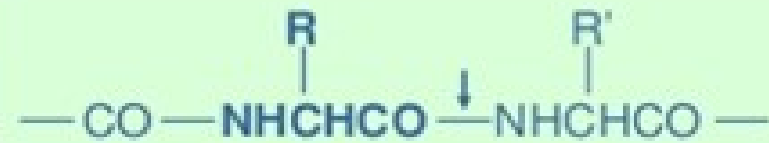


## Varenje u tankom crevu: Pankreasni enzimi

- 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: **Karboksipeptidaza A** Proenzim: Prokarboksipeptidaza A
- Aktivator:
  - Tripsin
- Specifičnost (R):
  - Val, Leu, Ile, Ala



- Enzim: **Karboksipeptidaza B**
- Proenzim: Prokarboksipeptidaza B
- Aktivator:
  - Tripsin
- Specifičnost (R):
  - Arg, Lys

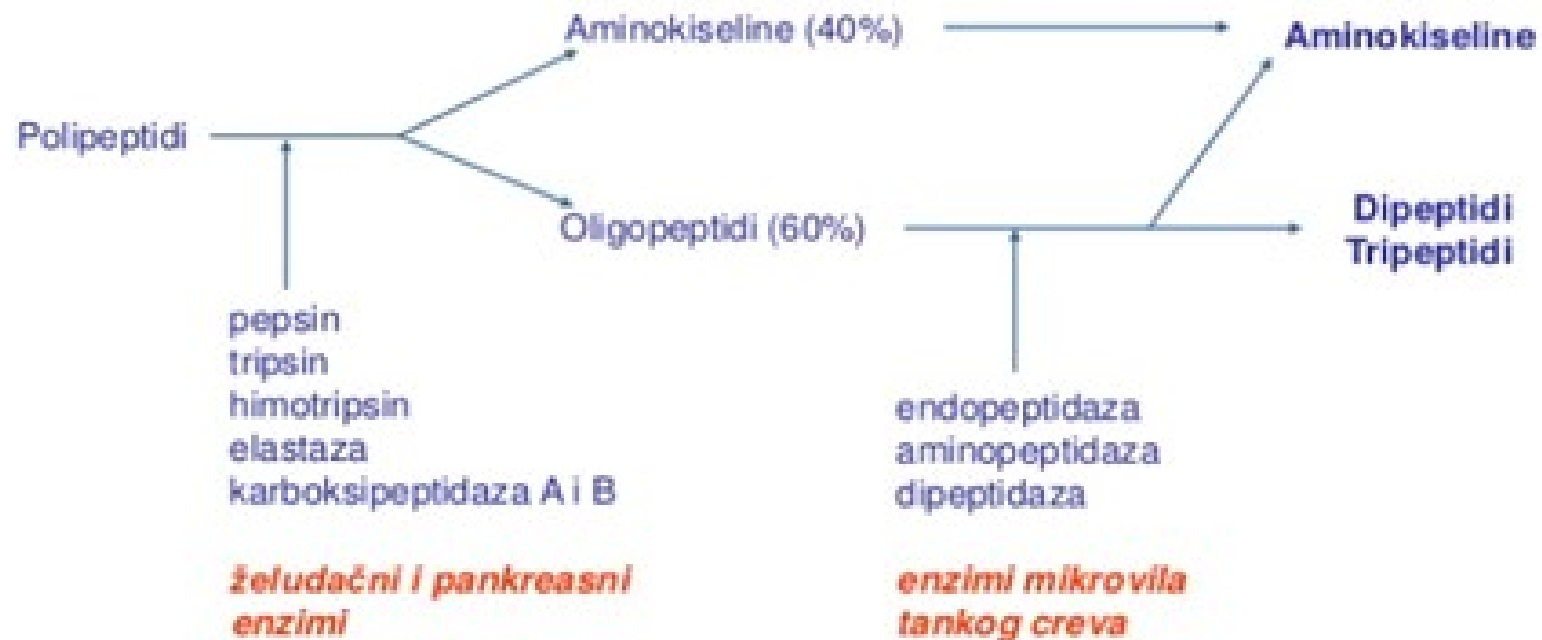


## Varenje u tankom crevu: Membranski enzimi mikrofila enterocita

- 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:

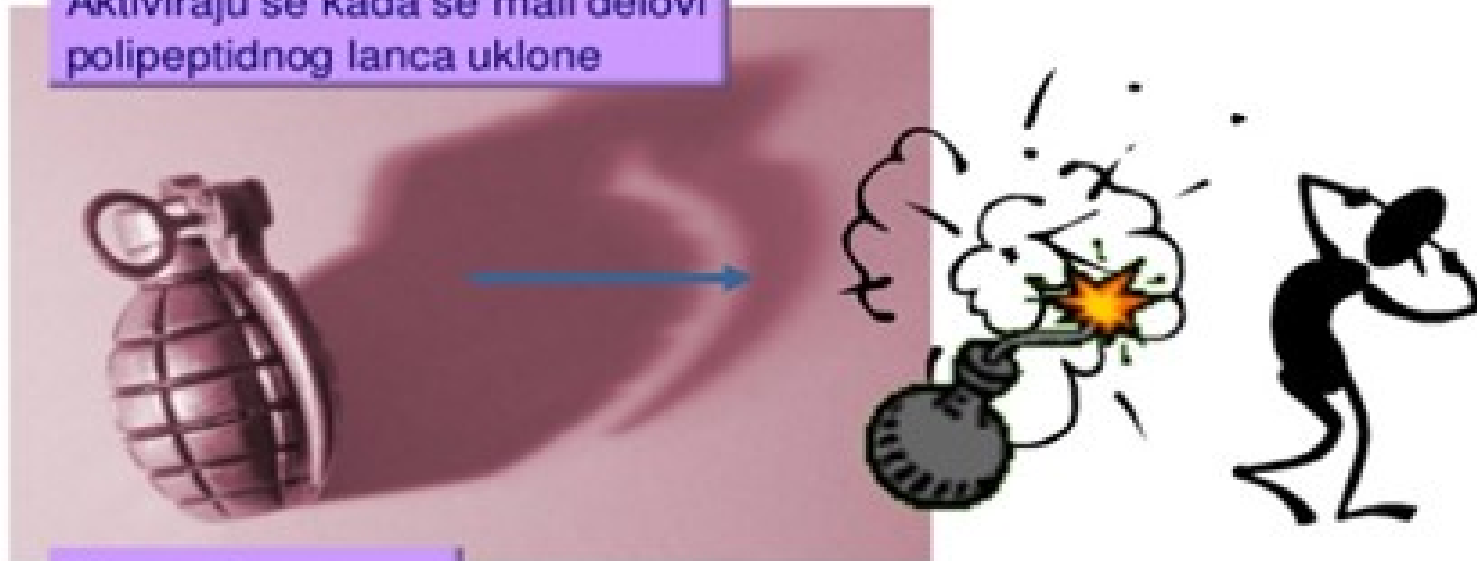
1. Pankreasne proteaze: tripsin, himotripsin i elastaze.
2. Razne intracelularne proteaze poput elastaze leukocita
3. Prohormon konvertaza (PC)
4. Faktori koagulacije su enzimi - serin proteaze
5. Fibrinolitički enzimi plazmin i njegovi aktivatori
6. Neki enzimi sistema komplementa

## 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

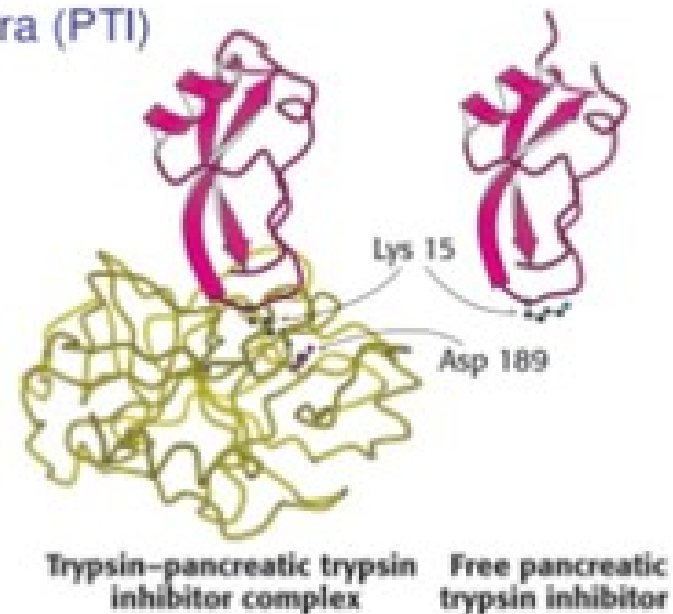
## Značaj sinteze proteolitičkih enzima u vidu zimogena

Zaštita od razgradnje proteina tkiva, pankreasa.

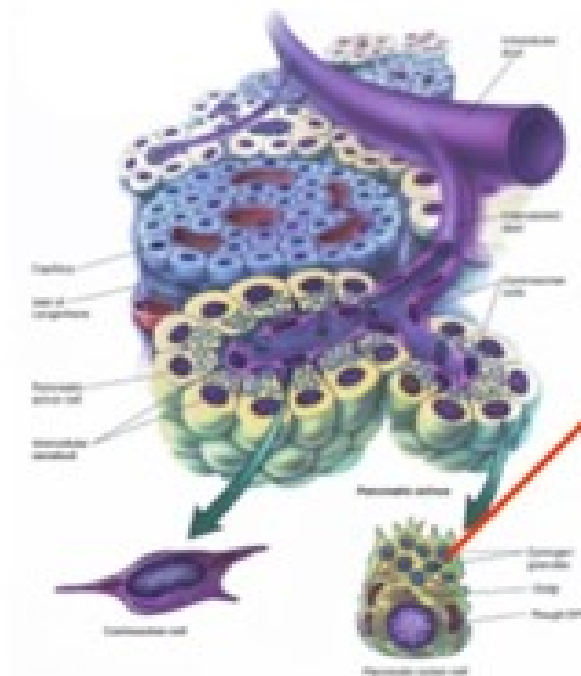
Prerana aktivacija zimogena se sprečava (3 varijante):

1. Sintezom enzima u vidu zimogena
2. Čuvanjem ovih zimogena u vezikulama rezistentnim na dejstvo proteaza
3. Prisustvom pankreasnog tripsin inhibitora (PTI)

- Pankreasni tripsin inhibitor (PTI)
- mali protein 6K
- Čvrsto vezan za aktivno mesto kao supstrat ali se ne razlaže.



## Proteolitički enzimi pankreasa



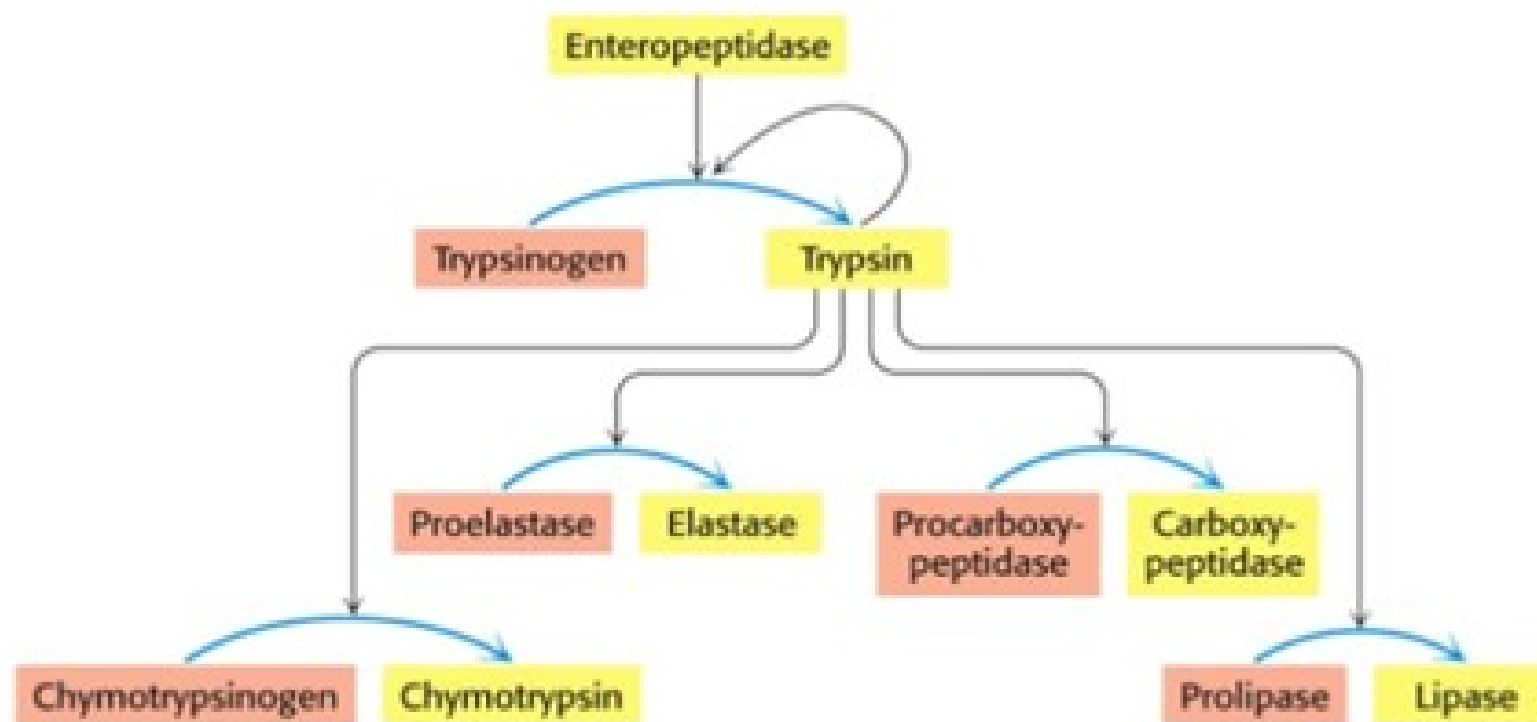
### Zimogeni enzimi

- tripsinogen
- himotripsinogen
- proelastaza
- prokarboksipeptidaza

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

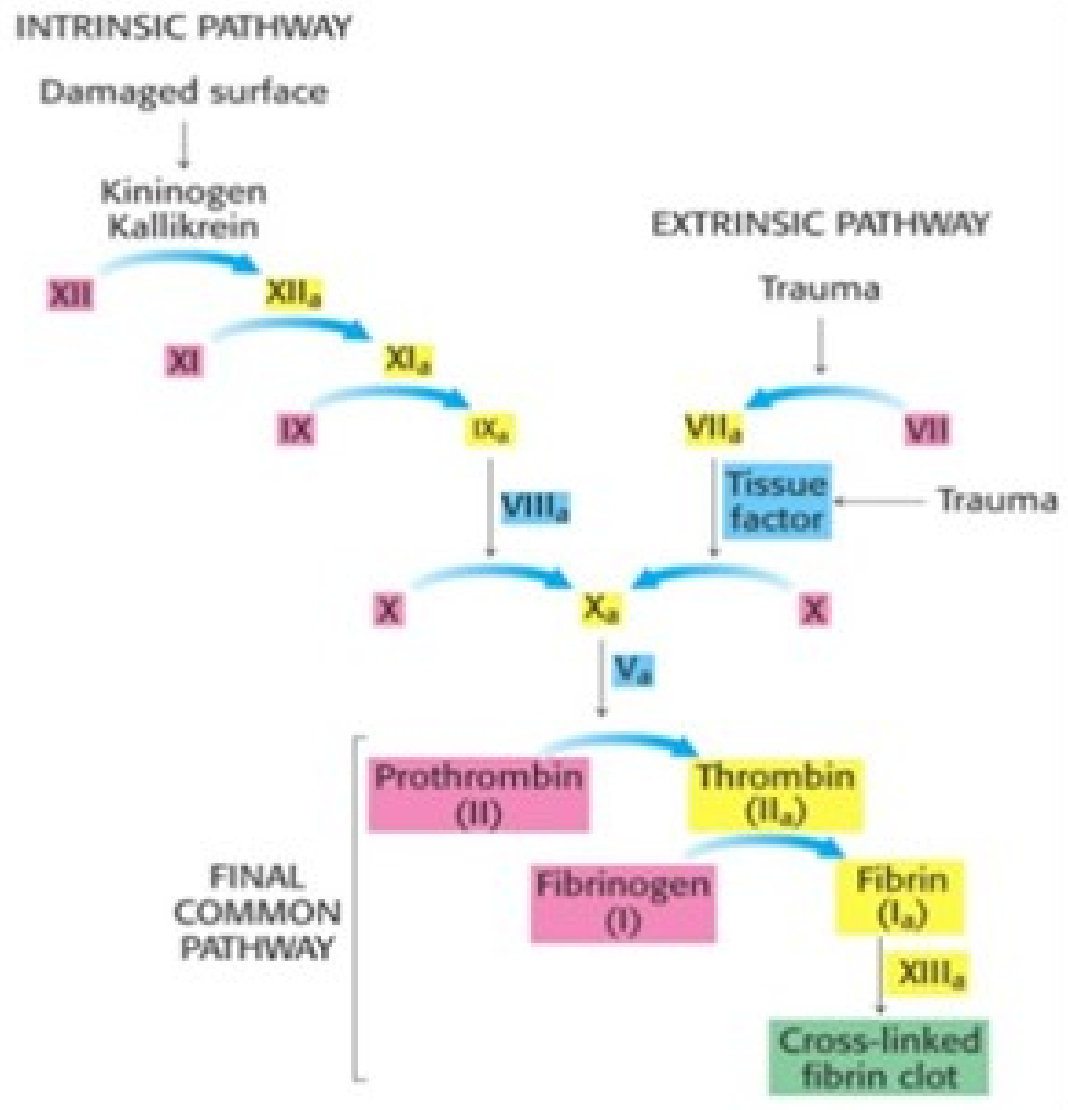
**(aktivan)**  
**u intestinumu**

## Aktivacija zimogena Kaskadne reakcije



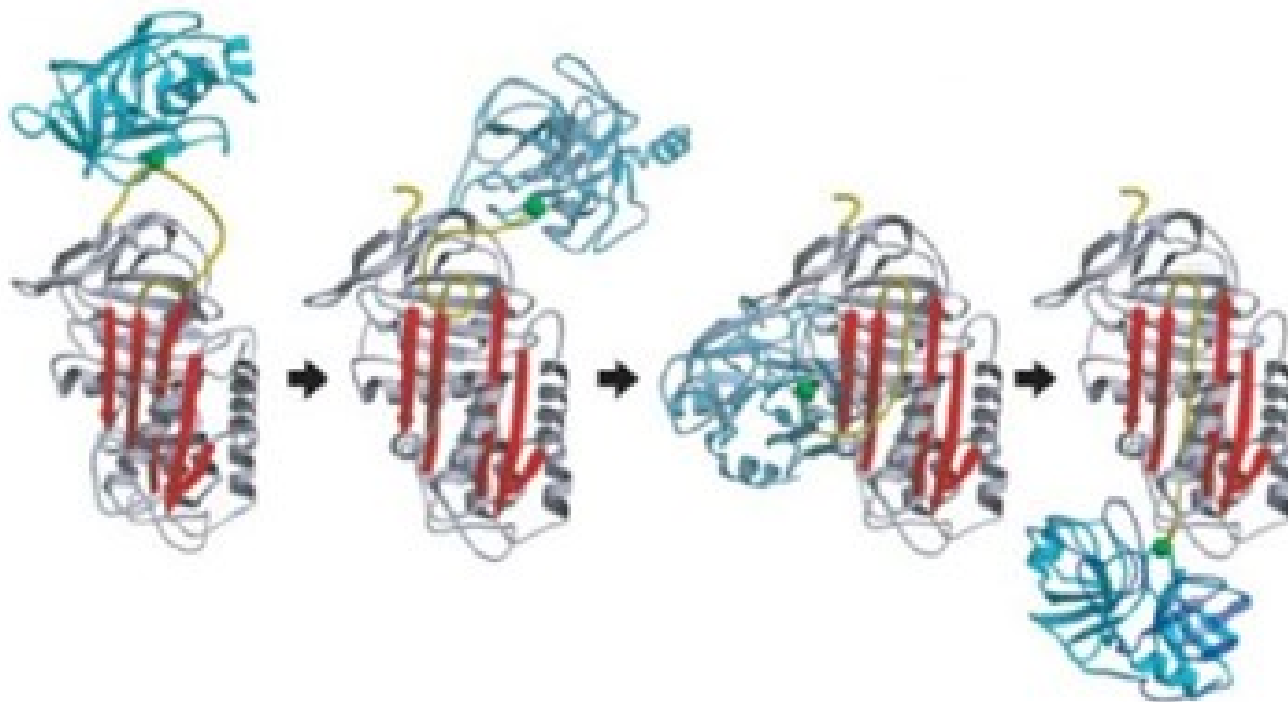


Proces koagulacije  
Aktivacija zimogena  
Kaskadne reakcije



# 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 tripsina Tripsin-1 katjonski tripsin

- Kod zdravih osoba slobodan tripsinogen-1 je glavna forma prisutna u serumu
- Posle **akutnog napada pankreatitisa**, serumski TRY-1 se povećava paralelno sa aktivnošću amilaze
- Maksimalno dostignute vrednosti su 2 do 400 puta veće od URL
- Distribucija različitih formi TRY-1 je povezana sa tipom i težinom akutnog pankreatitisa
- U blagoj formi AP 80-99% TRY-1 postoji kao tripsinogen-1 sa manjim proporcijama vezanog TRY-1
- U težim oblicima AP gde je mortalitet 20% pa i do 50 %, proporcija slobodnog tripsinogena je niza i do 30 % od ukupnog
- Postoje i odgovarajuće proporcije  $\alpha_1$  antitripsina i  $\alpha_2$ -makroglobulina vezanog za TRY-1.

## Klinički značaj tripsina

### Tripsin-1 katjonski tripsin

- TRY-1 je povećan **kod hroničnog oštećenja bubrega**, kao što je povećana AMY i LPS. Bubrežno oštećenje se mora uzeti u obzir pri interpretaciji povećanih vrednosti
- **Hronični pankreatitis**
- Bez steatoreje
  - Nema promena plazmatske koncentracije TRY-1
- Sa steatorejom
  - Vrlo niska koncentracija tripsina.
- U povratnoj fazi hroničnog pankreatitisa plazmatski TRY može biti značajno povećan.
- U **karcinomu pankreasa** TRY koncentracije mogu biti normalne, visoke ili niske.
- U poređenju sa merenjem P-AMY i LPS, merenje TRY-1 je teže izvodljivo, i duže. Merenje tripsina se ne može rutinski primeniti kod akutnog pankreatitisa, ovaj test ima limitiranu kliničku vrednost.

## Klinički značaj tripsina

### Tripsin-1 katjonski tripsin

- **Cistična fibroza** je genetsko oboljenje koje primarno zahvata pluća i digestivni trakt
- Rezultira produkcijom gustog mukosa koja blokira duktus pankreasa, i na taj način se sprečava normalan transport tripsinogena
- U ovim uslovima plazmatska koncentracija TRY je visoka kod novorođenčadi, a pošto bolest napreduje aktivnost opada
- Skrining novorođenčadi se radi merenjem **imunoreaktivnog tripsinogena**, i u suvim uzorcima krvi (mrlje krvi).
- Deca sa visokim koncentracijama TRY moraju da se prate i da se ponovi test posle 1 i 3 nedelja ili inicijalno iz kapi krvi da se utvrdi specifična DNK mutacija.

## Klinički značaj tripsina

### Tripsin-2 anjonski tripsin

- Serumski tripsinogen-2 je viši od tripsinogena-1 u akutnom pankreatitisu 10x
- Velike količine tripsinogena-2 se izlučuje putem urina
- Određivanje tripsinogena imunofluorimetrijski ili kvalitativnim brzim testom za merenje tripsinogena-2
  - visoka senzitivnost
  - visoka negativna prediktivna vrednost za dijagnozu akutnog pankreatitisa pri prijemu u bolnicu
  - pozitivna prediktivna vrednost vrlo niska
- Stvoreni tripsin je inaktiviran stvaranjem kompleksa sa  $\alpha_1$ -antitripsinom
- Određivanje ovog kompleksa sa TRY-2 ima prednost u odnosu na tripsinogen-2 i AMY u akutnom pankreatitisu
- Preliminarna istraživanja



# Himotripsin

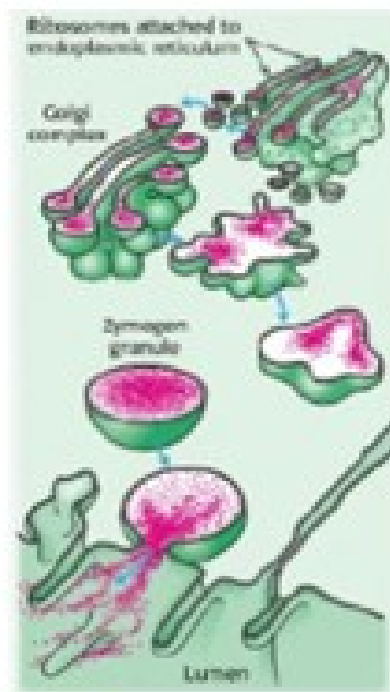
- Himotripsin sistemski broj EC 3.4.21.,
- Skraćenica CHY, nema sistemsko ime
- Serin-proteaza
- Specifičnost (R):
  - Tyr, Trp, Phe, Met, Leu – aromatične aminokiseline
  - Specifičnost himotripsina u poređenju sa tripsinom je da on deluje na veze amino grupa aromatičnih aminokiselina



- Himotripsin pokazuje i hidrolitičku aktivnost i na druge tipove veza prema sledećem redosledu:
- Estri (posebno N-supstituisane tirozinske estre) >amide> peptide

# Himotripsinogeni

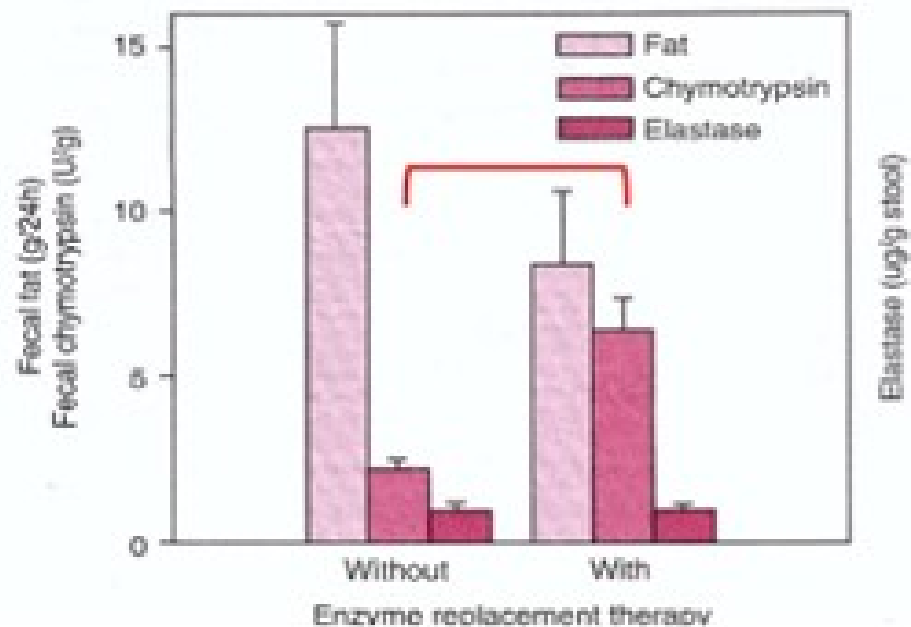
- Acinarne ćelije humanog pankreasa sintetišu 2 himotripsina: (himotripsin 1 i 2, pri čemu je broj dva važniji) u vidu inaktivnih proenzima ili zimogena
- himotripsinogen-1 i himotripsinogen-2
- Ovi zimogeni se deponuju u granulama i sekretuju u pankreasni kanal kao i tripsinogen
- U intestinalnom traktu himotripsinogen se pretvara u himotripsin dejstvom tripsina
- Himotripsin je manje podložan razgradnji u GIT u odnosu na tripsin i zato se može određivati i u fecesu
- CHY-1 je anjonski a CHY-2 katjonski i dominira katjonska forma
- Molekulske mase su istovetne oko 25000
- Postoji imunološka sličnost između himotripsina i himotripsinogena.
- CHY kao i TRY je vezan za alfa-1-antitripsin i alfa-2-makroglobulin



## 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

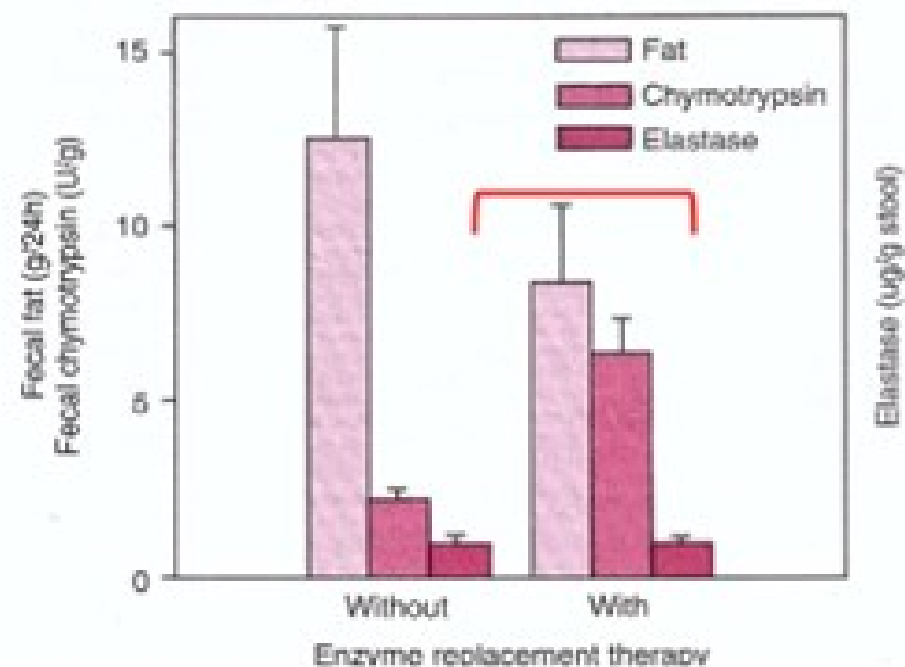
# Elastaza-1

- 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 eritrocita.

- Ekstralizosomalna ACP je prisutna u mnogim ćelijama

## Distribucija u tkivima

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



# Izoenzimi i izoforme kisele fosfataze

Pet tipova kisele fosfataze (4 izoenzima)

Elektroforetska pokretljivost na PAAG

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

# 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 tokom 3 sata na sobnoj temperaturi
  - Acidifikacija seruma na pH ispod 6,5 pomaže u stabilizaciji aktivnosti.
- Uticaj jona, aktivatora i inhibitora
  - Na aktivnost ne utiču joni  $Mg^{2+}$  i  $Zn^{2+}$ .



# Izoenzimi kisele fosfataze

## Lizozomalna 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 p karcinoma prostate ali sada je u potpunosti zamenjena sa prostata- s antigenom (PSA).
- Novija ispitivanja prognostičkog značaja PACP
- Vrednosti su višestruko povećane kod karcinoma prostate



# Osteoklastna kisela fosfataza

## Tartarat rezistentna kisela fosfataza

### Svojstva izoformi TRACP

- Izoforme se razlikuju u sadržaju ugljenih hidrata
- ACP 5a sadrži sijalinsku kiselinu i manozu, a ACP5b samo manozu.
- Forma 5b je dimer dok je 5a monomer

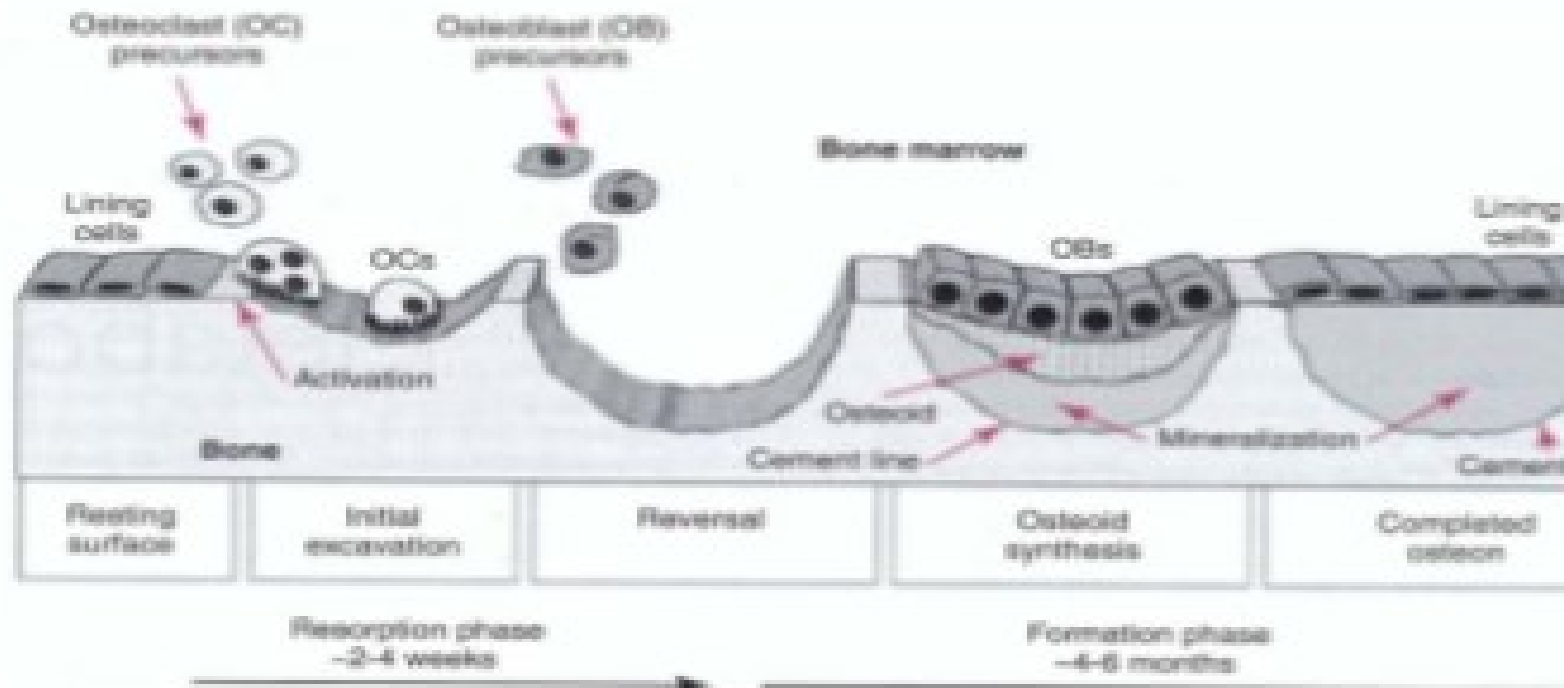
Sintetiše se u inaktivnoj formi

Aktivacija dejstvom cistein proteinaze

- u serumu se javljaju dve forme
- aktivna i neaktivna forma



# Remodelovanje kostiju i oslobađanje





## Klinički značaj tartarat rezistentne kisele fo

Blaga ili umerena povećanja serumske TR-ACP

1. Pagetova bolest
2. Hiperparatioridizam sa manifestacijama na kostima
3. Malignim invazijama na kostima pri kanceru dojke ko
4. Osteoklastoma tumor giant ćelija - osteoklastna neop
5. Osteopetrosis – marmerna bolest kostiju gdje osteokl

# 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:

