

Univerzitet Crne Gore

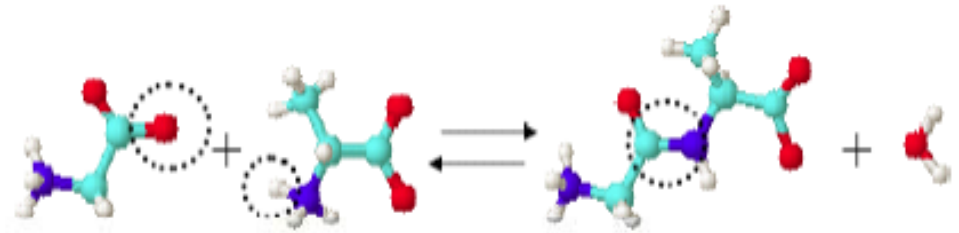
Medicinski fakultet

Katedra za medicinsku biohemiju i hemiju

# LABORATORIJSKO ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI AMILAZE



# Proteini. Enzimi

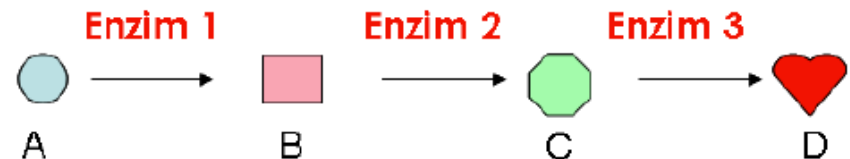
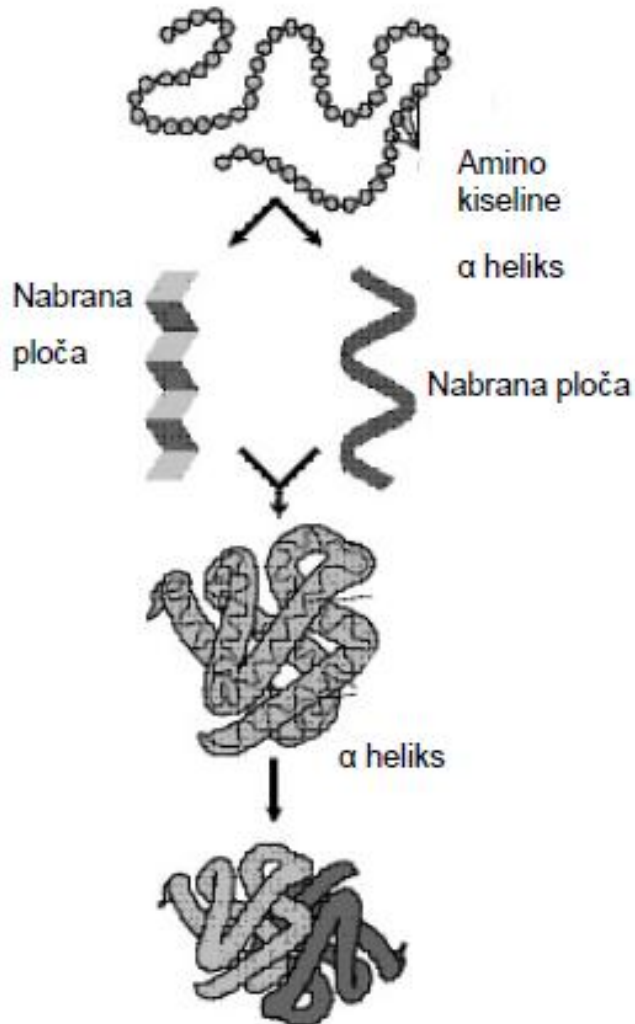


Važne **osobine** enzima su:

- ✓ Povećavaju **brzinu** hemijske reakcije
- ✓ Visoka **specifičnost** prema reakciji
- ✓ Aktivnost im se može **regulisati**

Značaj enzima:

- ✓ Regulišu ćelijski metabolizam
- ✓ Markeri u dijagnostici
- ✓ Ciljno mjesto djelovanja nekih lijekova
- ✓ Deficit => ozbiljni poremećaji



# Enzimi – koji postoje? koliko ih ima?

Class	Reaction type	Important subclasses
1 Oxidoreductases	<p>○ = Reduction equivalent</p> <p>A<sub>red</sub> + B<sub>ox</sub> ⇌ A<sub>ox</sub> + B<sub>red</sub></p>	Dehydrogenases Oxidases, peroxidases Reductases Monooxygenases Dioxygenases
2 Transferases	<p>A-B + C ⇌ A + B-C</p>	C <sub>1</sub> -Transferases Glycosyltransferases Aminotransferases Phosphotransferases
3 Hydrolases	<p>A-B + H<sub>2</sub>O ⇌ A-H + B-OH</p>	Esterases Glycosidases Peptidases Amidases
4 Lyases ("synthases")	<p>A + B ⇌ A-B</p>	C-C-Lyases C-O-Lyases C-N-Lyases C-S-Lyases
5 Isomerases	<p>A ⇌ Iso-A</p>	Epimerases <i>cis trans</i> Isomerases Intramolecular transferases
6 Ligases ("synthetases")	<p>A + B + XTP ⇌ A-B + XDP                      X = A, G, U, C</p>	C-C-Ligases C-O-Ligases C-N-Ligases C-S-Ligases

www.brenda-enzymes.org/all\_enzymes.php

BRENDA  
The Comprehensive Enzyme Information System

All enzymes in BRENDA™

For a more structured view of enzymes/EC Numbers and enhanced search capabilities please go to the [EC Explorer](#)

Number of different enzymes: 6671

EC Number	Recommended Name	History	Show details
1.1.1.1	alcohol dehydrogenase	-	(long) (short)
1.1.1.2	alcohol dehydrogenase (NADP)	-	(long) (short)
1.1.1.B3	(S)-specific secondary alcohol dehydrogenase	preliminary BRENDA-supplied EC number	(long) (short)
1.1.1.3	homoserine dehydrogenase	-	(long) (short)
1.1.1.B4	(R)-specific secondary alcohol dehydrogenase	preliminary BRENDA-supplied EC number	(long) (short)
1.1.1.4	(R,R)-butanediol dehydrogenase	-	(long) (short)
1.1.1.5	acetoin dehydrogenase	transferred to EC 1.1.1.303 and EC 1.1.1.304	(long) (short)
1.1.1.6	glycerol dehydrogenase	-	(long) (short)

es: 6671

d Name

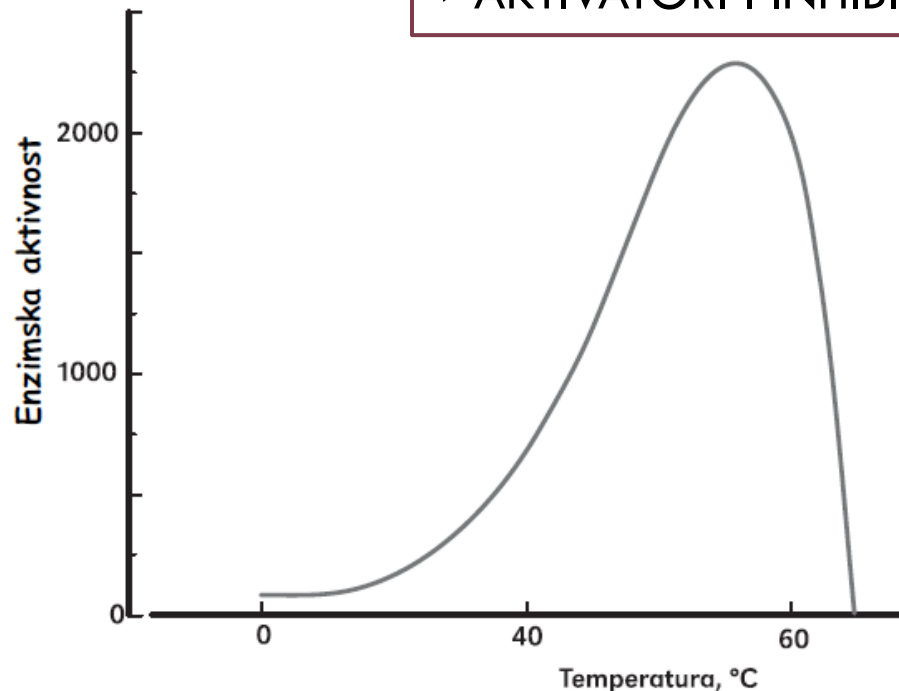
# Faktori koji utiču na aktivnost enzima

## ĆELIJA:

- ❖ Neutralan pH
- ❖ Umjerena temperatura
- ❖ Atmosferski pritisak
- ❖ Niska koncentracija reaktanata

## FAKTORI:

- ✓ TEMPERATURA
- ✓ pH
- ✓ KOLIČINA SUPSTRATA
- ✓ KOLIČINA ENZIMA
- ✓ AKTIVATORI I INHIBITORI



# Faktori koji utiču na aktivnost enzima

## FAKTORI:

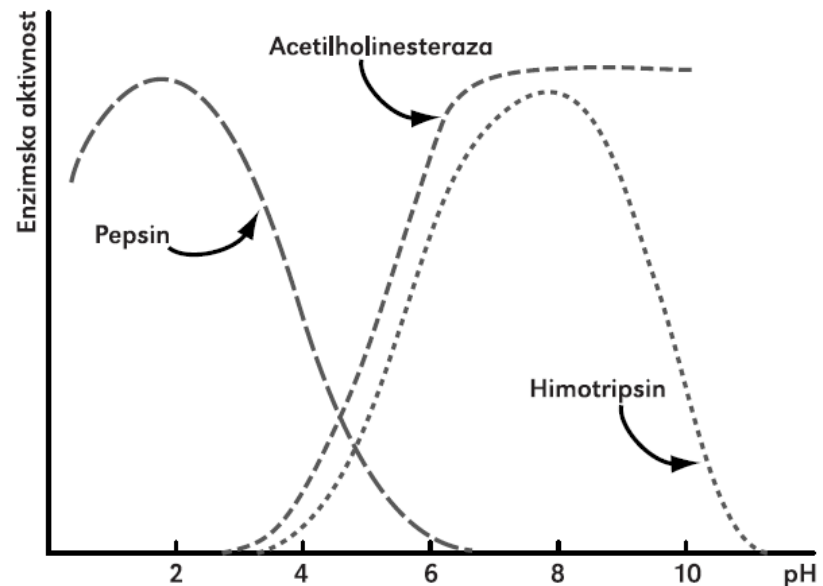
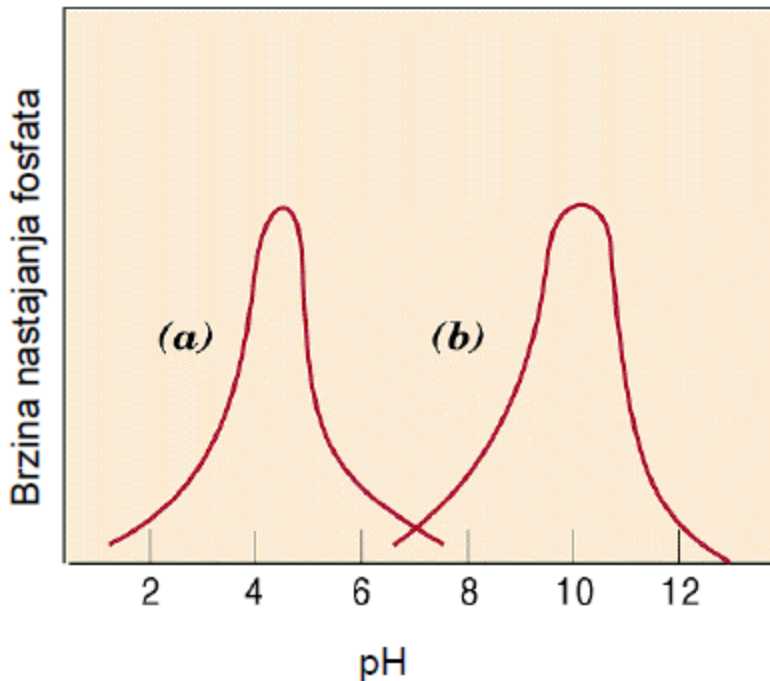
- ✓ TEMPERATURA
- ✓ pH
- ✓ KOLIČINA SUPSTRATA
- ✓ KOLIČINA ENZIMA
- ✓ AKTIVATORI I INHIBITORI

## pH utiče na:

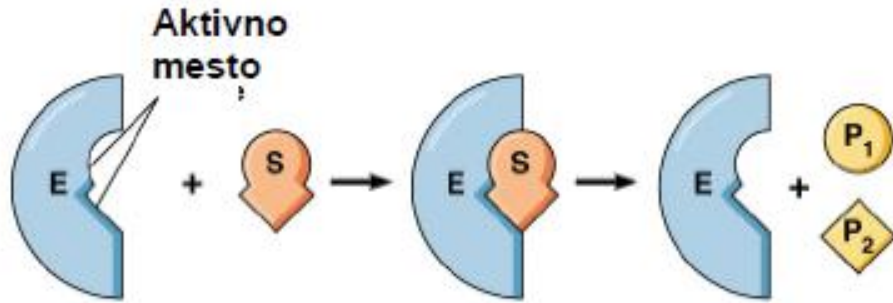
- stepen jonizacije supstrata
- stepen jonitacije funkcionalnih grupa AK u AM
- konformaciju enzima u cjelini

a- kisela fosfataza

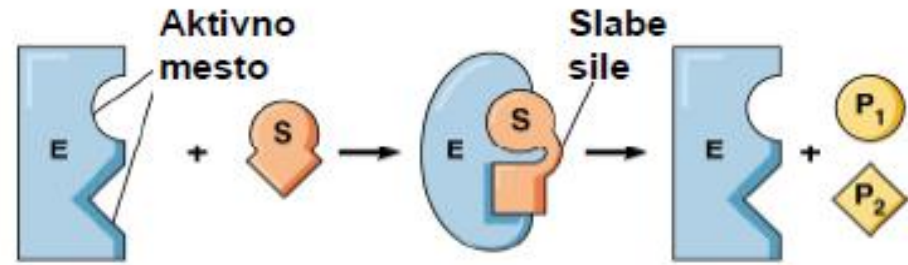
b- alkalna fosfataza



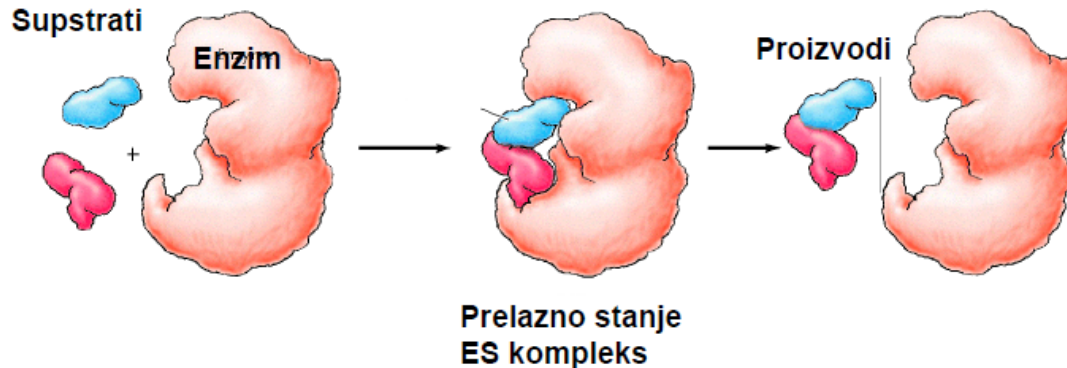
# Mehanizam enzimske katalize



**MODEL „KLJUČ I BRAVA,,**  
(Fischer, 1894)



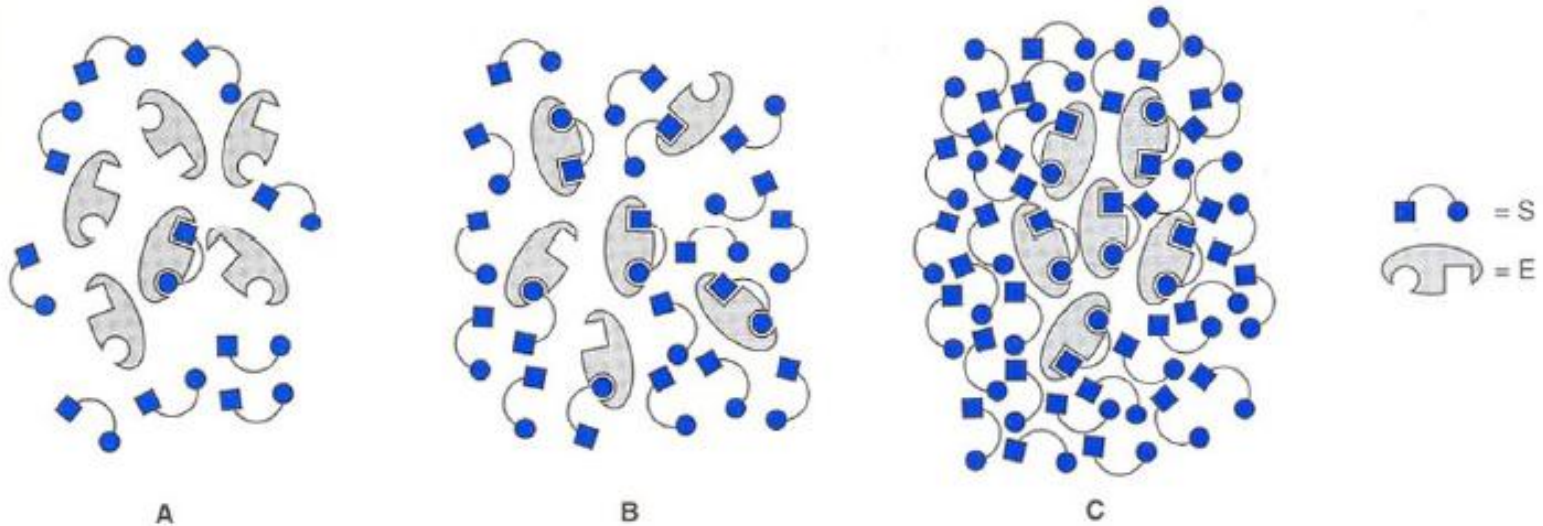
**MODEL INDUKOVANOG PRILAGOĐAVANJA**  
(Koshland, 1958)



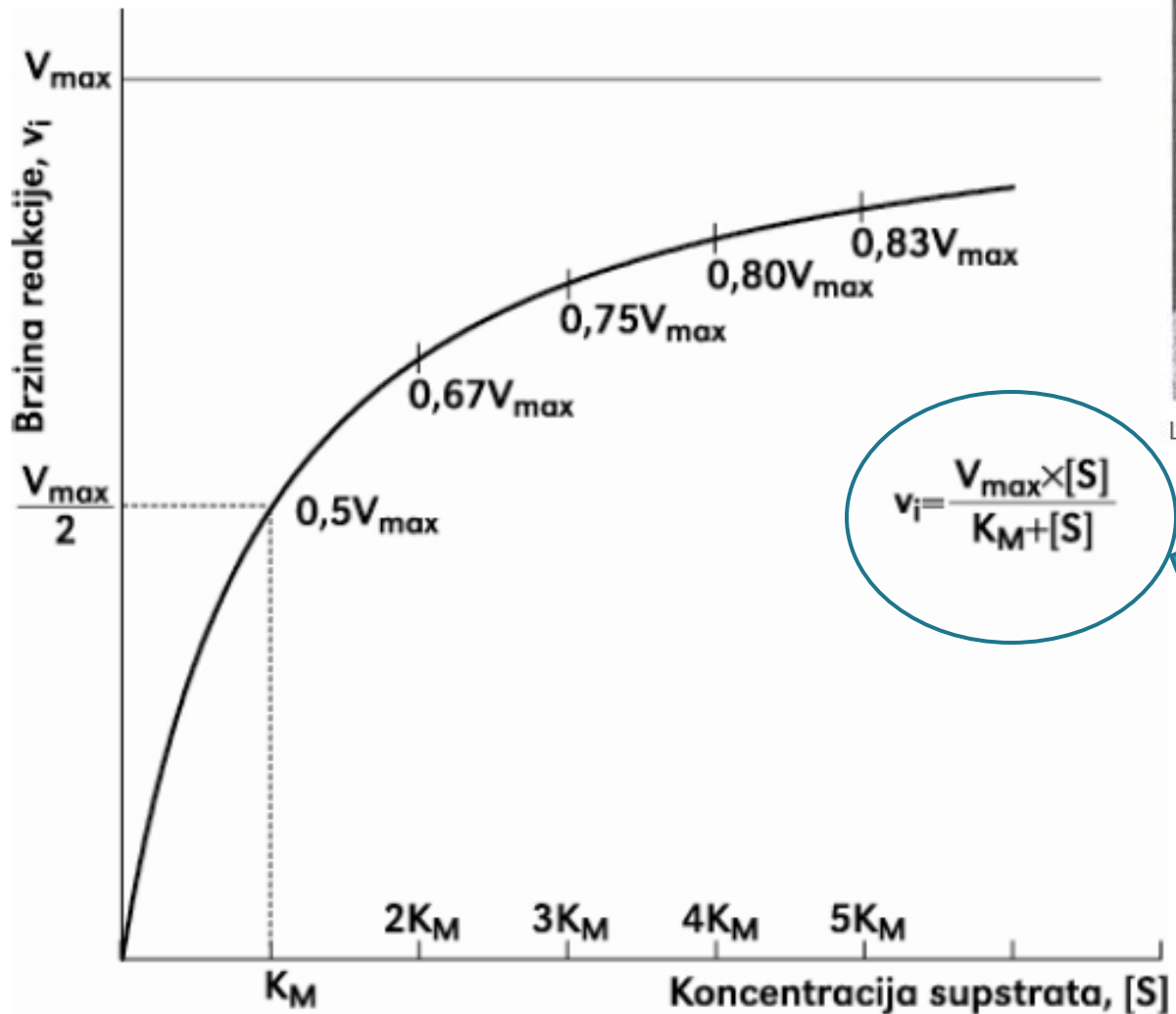
# Faktori koji utiču na aktivnost enzima

## FAKTORI:

- ✓ TEMPERATURA
- ✓ pH
- ✓ KOLIČINA SUPSTRATA
- ✓ KOLIČINA ENZIMA
- ✓ AKTIVATORI I INHIBITORI



# Količina enzima i supstrata



Leonor Michaelis, 1875–1949



Maud Menten, 1879–1960

$$v_i = \frac{V_{max} \times [S]}{K_M + [S]}$$

$$v_i = \frac{V_{max} \times [S]}{K_M + [S]}$$



# Koenzimi

Enzim + Kofaktor/koenzim = Holoenzim  
(protein) (nije protein)  
apoenzim



**HIPOVITAMINOZE = BOLESTI KOENZIMA**

# Koenzimi

VITAMIN	KOEZIM ILI PROSTETIČNA GRUPA	KATALISANA REAKCIJA	REAKTIVNA GRUPA KOENZIMA
Tiamin (B1)	Tiamin pirofosfat	Dekarboksilacija Transketolacija	Tiazolijumski prsten
Riboflavin (B2)	Flavin koenzimi	Oksido-redukcija	Izoaloksazonski prsten
Nikotinat (B3)	Nikotinamidni koenzimi (NAD i NADP)	Oksido-redukcija	Nikotinamidni deo molekula
Piridoksin (B6)	Piridoksal fosfat	Transaminacija, Dekarboksilacija	Aldehidna grupa na C4 piridinskog prstena
Folna kiselina	Tetrahidrofolna kiselina	Prenos i interkonverzija C1 ostatka	N5 i N10 pteridinskog prstena
Kobalamin (B12)	Koenzim B12	Prenos metil grupe	
Biotin (H)	Biotini-protein	Karboksilacija	
Pantotenska kiselina (B5)	CoA	Tioesterifikacija i modifikacija tioestara	SH-grupa
Liponska kiselina	Lipoamid-protein	Oksidoredukcija i prenos acil grupa	SH-grupa

# Metali kao kofaktori

METAL	PRIMER ENZIMA	ULOGA METALA
Fe	Citohrom oksidaza	Oksido-redukcija
Cu	Oksidaza askorbinske kiseline	Oksido-redukcija
Zn	Alkoholna dehidrogenaza	Omogućava vezivanje NAD <sup>+</sup>
Mn	Histidin-amonijak liaza	Pomaže u katalizi prihvatanjem elektrona
Ni	Ureaza	Katalitičko mesto
Se	Glutation peroksidaza	U aktivnom mestu zamenjuje S u Cisteinu

# Amilaza ( $\alpha$ -1,4 glukano-4 glukano hidrolaza, EC 3.2.1.1)

Pripada klasi **hidrolaza**, katalizuje hidrolizu **1,4  $\alpha$ -glikozidnih veza** u polisaharidima.

Ona je **kalcijum**-metaloenzim (kalcijum neophodan za funkcionalni integritet), a puna aktivnost u prisustvu **Cl<sup>-</sup>**.

Molekularna masa: 55-60 hiljada

Prolazi glomerularnu membranu. **JEDINI ENZIM SERUMA KOJI SE NORMALNO NALAZI U URINU!**

Nalazi se u brojnim tkivima i organima, prije svega u **PANKREASU (40%)** i **PLJUVAČNIM ŽLIJEZDAMA (60%)**. Vrlo mala aktivnost nađena u testisima, ovarijumima, jajovodima, suzama i mlijeku. Neki tumori pluća i ovarijuma mogu lučiti male količine amilaze. Nema aktivnosti u jetri.

# Amilaza ( $\alpha$ -1,4 glukano-4 glukano hidrolaza, EC 3.2.1.1)

Enzim u **serumu i urinu** je porijeklom iz:

**PLJUVAČKE** i **PANKREASA.**

Enzim u **urinu** je porijeklom iz plazme, a ascit i pleuralna tečnost mogu sadržati amilazu usljed prisustva tumora ili u sklopu pankreatitisa.

Govorimo o dva prava **izoenzima**:

**P** – pankreasna amilaza

**S** – salivarna amilaza

Optimum pH: 6,9-7,0.

**Najznačajniji je marker akutnog pankreatitisa!**

# Akutni pankreatitis

## Uzroci:

1. **Alkoholizam**
2. **Žučni kamenci**
3. **Hiperlipidemija**
4. **Hiperkalcemija**
5. **Ishemija**
6. **Ostali**



- povećanje aktivnosti posle 2 - 12 sati
- maksimum posle 12 - 72 sata
- vraćanje na normalu posle 3 - 4 dana

**Aktivnost povećana u serumu 4 - 6 puta**

- nije u korelaciji sa težinom oboljenja, ali veće aktivnosti ukazuju na ovo oboljenje; u 20 % slučajeva aktivnost enzima normalna

**Aktivnost amilaze u urinu bolji pokazatelj**

- češće povećana, veće povećanje, duže povećana.

# Amilaza u drugim oboljenjima

Zapaljenja i oštećenja pljuvačnih žlijezda  
Perforacija ulkusa  
Perforacija tube uterine  
Insuficijencija jetre  
Trauma mozga  
Postoperativno  
Renalna insuficijencija  
Neoplazme

**UVIJEK JE POVEĆANJE  
MANJE OD 5X**



**HVALA ZA PAŽNJU !**

HVALA ZA PAŽNJU !