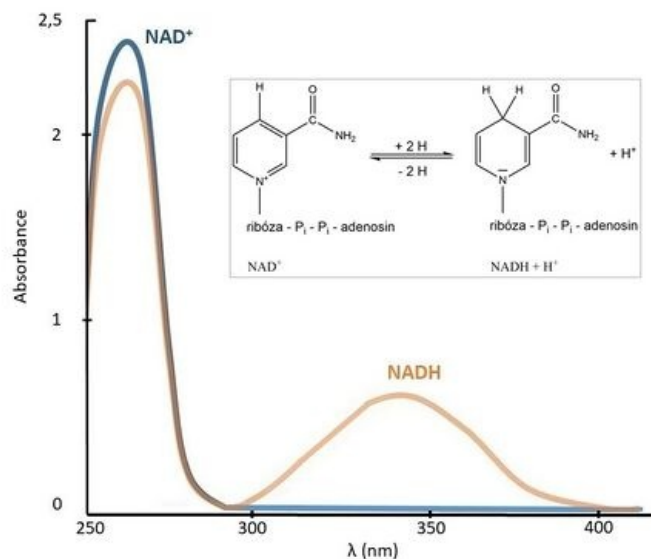


Warburgův optický test

Když **Otto Heinrich Warburg (1883–1970)**, německý biochemik a později **nositel Nobelovy ceny za fyziologii a lékařství (1931)**, poprvé využil ke sledování reakce katalyzované enzymem absorpčních vlastností pyridinových koenzymů, netušil patrně, jak významně se tento objev uplatní v klinické chemii. Převážná většina dnes rutinně používaných metod ke stanovení aktivity enzymů je založena přímo nebo nepřímo na fotometrii absorbance reakčních směsí, které obsahují pyridinový koenzym. Tento princip dal také metodě její označení „optický test“.

Reverzibilní hydrogenace nikotinamidadenindinukleotidu (NAD^+), která nastává na pyridinovém kruhu nikotinamidu, vede k redukované formě ($\text{NADH} + \text{H}^+$) a je provázena výraznou změnou absorpčního spektra. Zatímco oxidovaná forma (NAD^+) má absorpční maximum při vlnové délce 260 nm, je zrušení aromatického charakteru pyridinového jádra a jeho přechod v chinoidní formu ($\text{NADH} + \text{H}^+$) provázeno vznikem dalšího absorpčního maxima při 340 nm.



Reverzibilní hydrogenace NAD^+ a absorpční spektra NAD/NADH v ultrafialové oblasti.

Velikost, případně změny absorbance při vlnové délce 340 nm jsou přímo úměrné počtu redukovaných molekul koenzymu. Přeměna jednoho molu koenzymu zase odpovídá přeměně jednoho molu substrátu, a navíc lze tuto přeměnu sledovat v čase, tedy kontinuálně měřit rychlost reakce pomocí spektrofotometru.

Tak je možné připravit reakční směs ze sledovaného enzymu (nebo biologického materiálu, v němž ho stanovujeme), koenzymu a příslušného substrátu v optimální koncentraci, a za optimálního pH i teploty zjišťovat reakční rychlost měřením změn absorbance na vhodném fotometru při vlnové délce 340 nm.

Spřažené reakce

Vzhledem ke skutečnosti, že NAD^+ je koenzymem jen některých dehydrogenas a že existuje řada klinicky významných enzymů z jiných tříd než jsou právě oxidoreduktázy, používá se vedle „jednoduchého optického testu“ ještě častěji „složených optických testů“, kdy se výše uvedeného principu využívá pouze jako indikačnické reakce, zatímco vlastní reakce měřící aktivitu příslušného enzymu je předržena nebo dokonce spřažena v celou sérii s dalšími pomocnými reakcemi.

enzym	reakce	pomocná reakce	indikační reakce
alaninaminotransferasa EC 2.6.1.2 (http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC2/6/1/2.html)	alanin + 2-oxoglutarát \rightleftharpoons glutamát + pyruvát		LD: pyruvát + $\text{NADH} + \text{H}^+$ \rightleftharpoons laktát + NAD^+
kreatinkináza EC 2.7.3.2 (http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC2/7/3/2.html)	kreatinfosfát + ADP \rightarrow kreatin + ATP	HK glukóza + ATP \rightarrow Glc-6-P + ADP	Glc-6-PD Glc-6-P + NADP^+ \rightleftharpoons 6-P-glukonát + $\text{NADPH} + \text{H}^+$

Vysvětlivky:

LD – laktátdehydrogenáza (EC 1.1.1.27 (<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/27.html>))

HK – hexokináza (EC 2.7.1.1 (<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC2/7/1/1.html>))

Glc-6-PD – glukóza-6-fosfátdehydrogenáza (EC 1.1.1.49 (<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/1/49.html>))

Glc-6-P – glukóza-6-fosfát

Jako indikační reakce se také často používá peroxidasaová reakce, např. při stanovení glukózy či cholesterolu.

analyt	reakce	indikační reakce
glukóza	GOD glukóza + $\text{O}_2 \rightarrow$ glukonová kyselina + H_2O_2	POD H_2O_2 + fenol + 4-aminoantipyrin \rightarrow chinonimin (růžový) + 4 H_2O
cholesterol	CHE cholesterol + $\text{O}_2 \rightarrow$ 4-cholesten-3-on + H_2O_2	POD H_2O_2 + fenol + 4-aminoantipyrin \rightarrow chinonimin (růžový) + 4 H_2O

Vysvětlivky:

GOD – glukózaoxidáza (EC 1.1.3.4 (<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/3/4.html>))

CHE – cholesteroxidáza (EC 1.1.3.6 (<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/1/3/6.html>))

POD – peroxidáza (EC 1.11.1.7 (<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/11/1/7.html>))

Pozn. Práce Otto H. Warburga významně přesahuje nejen do laboratorní praxe a medicíny. Například Warburgův popis metabolismu transformovaných buněk se stal významným pilířem pro další výzkum nádorových onemocnění.