3 PRINCIPY LABORATORNÍCH STANOVENÍ

3.1 Stanovení pomocí kinetické metody a konstantního času

3.1.1 Stanovení katalytických koncentrací aminotransferáz v séru

Kinetická metoda: kontinuálním měřením absorbance v závislosti na čase opakovaným zaznamenáváním změn absorbance ve stejných časových intervalech. Měříme buď přírůstek nebo úbytek substrátu nebo koenzymu, případně jiného reaktantu. Jestliže stanovujeme koncentraci koenzymu typu NAD^+, $NADP^+$ nazýváme tento způsob měření optický test. Důležitý je také časový interval, ve kterém měříme. Většinou neměříme ihned na začátku enzymové reakce, neboť rychlost nebývá ještě konstantní, tuto fázi nazýváme lag-fáze. Měříme až v čase, kdy je rychlost reakce konstantní, tj. nezávisí na koncentraci reagujících látek. Tuto fázi reakce kontrolujeme. Automatické analyzátory mají tyto časy definovány v parametrech metod. Stejně tak i kontrolu vyčerpání substrátu.

Aminotransferázy jsou enzymy, které katalyzují transaminaci (přenos aminoskupiny z aminokyseliny na 2-oxokyselinu). Z klinicko-biochemického hlediska jsou nejvýznamnější alaninaminotransferáza (ALT) a aspartátaminotransferáza (AST).

Alaninaminotransferáza (ALT … L-alanin:2-oxoglutarát-aminotransferáza) katalyzuje reakci:

L-alanin + 2-oxoglutarát ↔ pyruvát + L-glutamát

Aspartátaminotransferáza (ASP … L-aspartát:2-oxoglutarát-aminotransferáza) katalyzuje reakci:

L-aspartát + 2-oxoglutarát ↔ oxalacetát + L-glutamát

Princip:

Stanovení aktivity ALT je založeno na měření rychlosti tvorby pyruvátu vznikajícího v reakci katalyzované alaninaminotransferázou z alaninu. Tato rychlost se určí s využitím spřažené enzymové reakce katalyzované laktátdehydrogenázou, v níž je pyruvát redukován na laktát:

pyruvát + NADH + H^+ ↔ L-laktát + NAD^+

Stanovení aktivity AST je analogické stanovení ALT. Vznikající oxalacetát v reakci katalyzované AST je ve spřažené reakci katalyzované malátdehydrogenázou redukován na malát:

oxalacetát + NADH + H^+ ↔ L-malát + NAD^+

Úbytek NADH se projeví poklesem absorbance reakční směsi při 340 nm (A_{340}). Za předpokladu dostatečně vysoké aktivity laktátdehydrogenázy, resp. malátdehydrogenázy v reakční směsi, rychlost poklesu A_{340} je úměrná aktivitě stanovovaných enzymů (ALT, resp. AST).

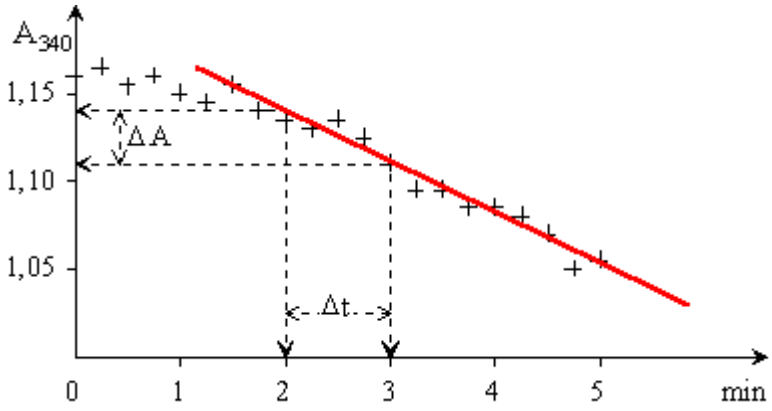
Stanovení je příkladem *kinetické metody* měření katalytické aktivity – během prvních minut reakce se zaznamenává (počáteční) rychlost úbytku substrátu nebo rychlost tvorby reakčního produktu (v našem uspořádání pomocí *optického testu*, tzn. měření rychlosti úbytku NADH).

Materiál: Set ALT firmy Roche Diagnostics*: ALT-činidlo (Tris pufr 110 mmol/l, pH 7,3; L-alanin 550 mmol/l; LDH ≥ 21,7 µkat/l; NADH 0,198 mmol/l; 2-oxoglutarát 16,5 mmol/l).
Set AST firmy Roche Diagnostics*: AST-činidlo (80 mmol/l Tris-pufr pH 7,8, L-aspartát 240 mmol/l, malátdehydrogenáza min. 7,67 kat/l, NADH 0,198 mmol/l, 2-oxoglutarát disodný 13,2 mmol/l). Vzorek krevního séra; mikropipetor 0,1 ml a 1 ml; spektrofotometr s temperovaným kyvetovým prostorem na 37 ºC; plastová nebo skleněná tyčinka.*Alternativně lze použít set fy Pliva-Lachema, pak složení činidla je odlišné.

- Vysvětlete význam všech reagencií.

Provedení (manuelní):

Kyvetu fotometru naplňte destilovanou vodou a při vlnové délce 340 nm fotometr vynulujte. Vodu z kyvety vylejte.
Do kyvety předehřáté na 37 °C odměřte 1 ml pracovního roztoku. Kyvetu vložte do kyvetového prostoru fotometru a nechejte 5 min předehřát (tuto dobu je nutné dodržet!).
Přidejte do kyvety mikrodávkovačem 0,1 ml vzorku séra a tyčinkou opatrně promíchejte. Tím je zahájena první enzymová reakce, v návaznosti na ni probíhá ihned reakce druhá. Zaznamenejte čas v okamžiku smíchání a v intervalech po 15 s zapisujte absorbance vzorku v kyvetě po dobu 5 minut.
Naměřené hodnoty vyneste do grafu. Z přímkové části grafu vypočítejte průměrnou rychlost poklesu absorbance ΔA340/min (viz obr.):



Výpočet katalytická koncentrace ALT v séru:

$$\text{katalytická koncentrace ALT} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min}}{\varepsilon_{NADH}} \cdot \frac{V_{CELK}}{V_{VZ}} \cdot \frac{1}{60} \cdot 10^6 = \Delta A_{340}/\text{min} \,.\, 29{,}10 \quad \mu\text{kat/l}$$

kde molární absorpční koeficient ε_{340}(NADH) = 6 300 1.mol^{-1}.cm^{-1}, podíl V_{CELK}/V_{VZ} koriguje objem reakční směsi na objem vzorku séra a zlomek 1/60 převádí rychlost poklesu absorbance z minut na sekundy.

- Vysvětlete význam všech složek vztahu pro výpočet katalytické koncentrace.

- Proč počáteční část grafu není přímková?

Hodnocení:

Pro zdravou populaci je referenční interval katalytické koncentrace ALT v rozmezí 0,1–0,8 μkat/l. Z lidských orgánů je největší aktivita ALT v játrech. Zvýšení katalytické koncentrace ALT v séru tak indikuje především porušení integrity cytoplazmatické membrány hepatocytů. Zvýšení ALT je často prvním nálezem v časné fázi akutní hepatitidy.

Referenční interval katalytické koncentrace AST je 0,1–0,5 μkat/l. Zvýšené hodnoty AST indikují porušení integrity cytoplazmatických membrán ve tkáních s vysokou aktivitou AST, nejčastěji v myokardu a jaterním parenchymu.

Význam stanovení AST a ALT v diagnostice hepatobiliárního poškození:

Aminotransferázy jsou citlivým ukazatelem většiny jaterních onemocnění, nejsou však pro ně specifické. Naopak nález fyziologické hodnoty ALT a AST vylučuje se značnou pravděpodobností hepatobiliární onemocnění. Více než dvacetinásobné zvýšení aktivity sérových aminotransferáz je charakteristické pro akutní virovou hepatitidu, akutní toxické poškození jater a stavy spojené s jaterní hypoperfuzí resp. hypoxií a městnáním (šok, akutní pravostranné srdeční selhání). Několikanásobné zvýšení transamináz provází řadu dalších jaterních chorob.
AST se asi 30 % nachází v cytoplazmě, zbytek v mitochondriích. Zvýšené hodnoty AST indikují porušení integrity cytoplazmatických membrán ve tkáních s vysokou aktivitou AST, nejčastěji v myokardu a jaterním parenchymu. Při zánětech jater převažují enzymy uvolňované z cytoplazmy a poměr AST/ALT je typicky < 1. Při nekróze jaterních buněk se zvýší i mitochondriální frakce AST a poměr AST/ALT > 1 (progrese do jaterní cirhózy). Poměr AST/ALT > 2 je pokládán za specifický test pro alkoholické jaterní choroby. Poměr AST/ALT > 1 je nalézán také u infarktu.

3.1.2 Stanovení katalytické koncentrace ALP v séru

End – point metoda: Metoda end-point (stanovení se provádí z celého průběhu reakce – do koncového bodu, všechen substrát musí zreagovat) – reakce musí být rychlá a kvantitativní. Koncentrace substrátu jsou často nízké, [S] <<K_M, koncentrace enzymu musí být dostatečně vysoká. Měří se výsledné množství produktu po proběhnutí reakce do konce (<99%)

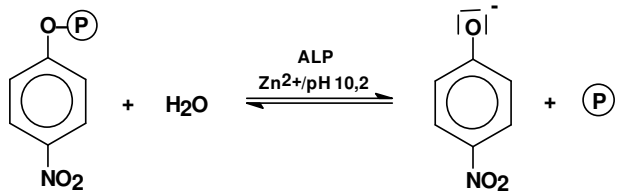
Alkalická fosfatáza (orthofosfátmonoester-fosfohydroláza, ALP) katalyzuje v alkalickém pH hydrolýzu fosfátových esterů, pro svoji aktivitu vyžaduje přítomnost hořečnatých/zinečnatých iontů. Vykazuje poměrně širokou substrátovou specifitu a nachází se v buňkách řady tkání a orgánů.

Jsou známy čtyři geny pro ALP. Tkáňově nespecifický gen ALP se vyskytuje v játrech, kostech a ledvinách. Zbývající tři geny ALP kódují střevní, placentární a embryonální izoenzymy ALP. Stanovení katalytické aktivity alkalické fosfatázy v séru se využívá hlavně pro posouzení hepatobiliárních a kostních onemocnění.

V séru za fyziologických podmínek aktivita celkové ALP zahrnuje především aktivitu jaterního a kostního izoenzymu. Střevní izoenzymy nejsou přítomny nebo se nachází jen ve velmi nízkém procentu. Placentární izoenzymy se fyziologicky nachází jen v těhotenství, jejich výskyt mimo toto období je průvodním jevem některých malignit.

Princip:

ALP štěpí syntetický chromogenní substrát 4-nitrofenylfosfát na 4-nitrofenol a fosfát. Mírou aktivity je ve zvolené metodě množství uvolněného nitrofenolátu, stanovené fotometricky po 10 minut trvající reakci a zastavení reakce inhibitorem enzymu.



V alkalickém prostředí je 4-nitrofenolát intenzivně žlutý, měří se absorbance při 400–420 nm. Tento způsob měření enzymové aktivity se označuje na rozdíl od kinetické metody jako *metoda konstantního času*. Ke kalibraci stanovení je použit kalibrační roztok 4-nitrofenolu.

Materiál: Set ALP firmy Erba Lachema: Pufr (*N*-methylglukamin pH 10,1; 0,35 mol/l) a substrát (4-nitrofenylfosfát, disodná sůl 15 mmol/l) v inkubační směsi. Kalibrační roztok 4-nitrofenolu (2,4 mmol/l),), inhibitor (roztok NaOH 1 mol/l s Chelatonem 3, 30 mmol/l), vzorky krevních sér. Mikropipetory 20, 200, 500 a 1 000 □l, vodní lázeň 37 °C, spektrofotometr Spekol 1300 a software WinAspect (nebo spektrofotometr Helios Delta a software VisionLite Fixed) s temperovaným kyvetovým prostorem na 37 ºC (Peltier termostat nebo vodní lázeň).

- Vysvětlete význam všech reagencií

Provedení:

☞ Odměřujte roztoky do 6 zkumavek podle schématu. Porovnávací roztok pro vzorek musí být připraven pro každý vzorek séra, aby se odstranil vliv žlutého zbarvení séra.

Zkumavka č.	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Reagencie (µl)	**Vzorek 1**	**Porovnávací roztok pro vzorek 1**	**Vzorek 2**	**Porovnávací roztok pro vzorek 2**	**Standard**	**Porovnávací roztok pro standard**
Pufr	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000
Sérum 1	20	-	-	-	-	-
Sérum 2	-	-	20	-	-	-
Kalibrační roztok	-	-	-	-	20	-
Demi-voda	-	-	-	-	-	20
Obsah zkumavek promíchejte a preinkubujte 5 až 10 min při 37 °C, pak přidejte substrát a demi-vodu ve 30sekundových intervalech						
Roztok substrátu	200	200	200	200	-	-
Demi-voda	-	-	-	-	200	200
Promíchejte a inkubujte přesně 10 minut od přidání substrátu při 37 °C, pak přidejte inhibitor v 30sekundových intervalech.						
Inhibitor	500	500	500	500	500	500
Sérum 1	-	20	-	-	-	-
Sérum 2	-	-	-	20	-	-
Obsah zkumavek promíchejte a do 30 min při vlnové délce 420 nm změřte absorbance* obou vzorků (A_x), porovnávacích roztoků pro vzorek (A_o) a standardu (A_{STD}) proti porovnávacímu roztoku pro standard (zkumavka č. 6).						

Výpočet katalytické koncentrace ALP:

Koncentrace 4-nitrofenolu v kalibračním roztoku (2400 µmol/l) při inkubaci 10 min (600 s) odpovídá katalytické koncentraci ALP (2400/600) 4 µkat/l. Poměr absorbancí vzorků a standardu odpovídá poměru katalytických koncentrací, z čehož pro katalytickou koncentraci ALP ve vzorku získáme vztah:

$$\text{ALP (µkat/l)} = \frac{A_x}{A_{\text{STD}}} \times 4$$

Hodnocení:

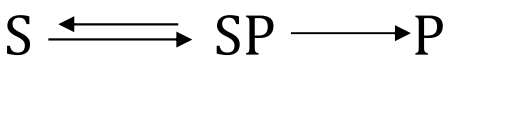
Referenční interval katalytické koncentrace celkové ALP v séru je pro dospělé 0,6–2,6 μkat/1, pro děti do 8 μkat/1 (což je výrazem osteoblastické aktivity při růstu kostí). Na těchto hodnotách se podílí zejména jaterní a kostní izoenzymy

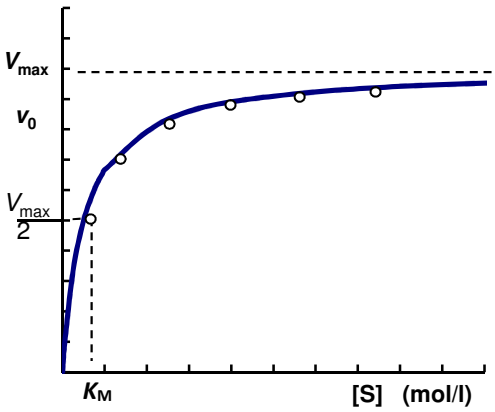
Význam stanovení ALP v diagnostice hepatobiliárního poškození:

Při hepatobiliárních onemocněních se v krvi zvyšuje aktivita jaterní ALP. Podstatná část jaterní ALP se nachází v buněčných membránách buněk výstelky žlučových cest. Při cholestáze dochází k narušení membrán jednak mechanickými vlivy, jednak detergenčním účinkem žlučových kyselin. Uvolněná ALP se pak dostává do krve. Vedle uvedeného mechanismu existují ještě další, např. zvýšení jaterní syntézy ALP. Vysoká hodnota ALP s převahou jaterního izoenzymu je charakteristická pro cholestázu a obstrukční ikterus. Vzácněji může provázet infekční mononukleózu. Mírné zvýšení ALP může být průvodní známkou řady jaterních onemocnění bez výraznější cholestatické složky. U některých nemocných s jaterní cirhózou převažuje střevní izoenzym, což se vysvětluje jeho sníženým vychytáváním v játrech. Hodnoty ALP je třeba vždy posuzovat v kontextu s ostatními ukazateli obstrukce, zejména s GGT.

3.2 Využití enzymů jako analytických činidel

Enzymy mohou být rovněž využity k měření koncentrace substrátu. Při stanovení musí být zachovány stejné obecné požadavky pro optimální průběh enzymové reakce. Jediný rozdíl je v tom, že rychlost reakce je limitována koncentrací substrátu (reakce prvního řádu vůči substrátu), zatímco koncentrace enzymu musí být taková, aby nelimitovala rychlost reakce. Na rozdíl od reakcí, při nichž se měří enzymová aktivita, reakce využívající enzymy ke stanovení koncentrace substrátu jsou obvykle kalibrovány paralelní analýzou substrátu o známé koncentraci. Podobně jako u enzymových esejí mohou být využívány spřažené reakce.





$$v_0 = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

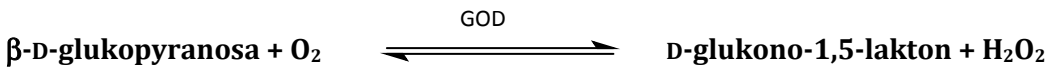
3.2.1 Enzymové stanovení glukózy v séru

Metoda end-point (stanovení se provádí z celého průběhu reakce – do koncového bodu, všechen substrát musí zreagovat) – reakce musí být rychlá a kvantitativní. Koncentrace substrátu jsou často nízké ([S] <<KM), koncentrace enzymu musí být dostatečně vysoká. Měří se výsledné množství produktu po proběhnutí reakce do konce (<99%)

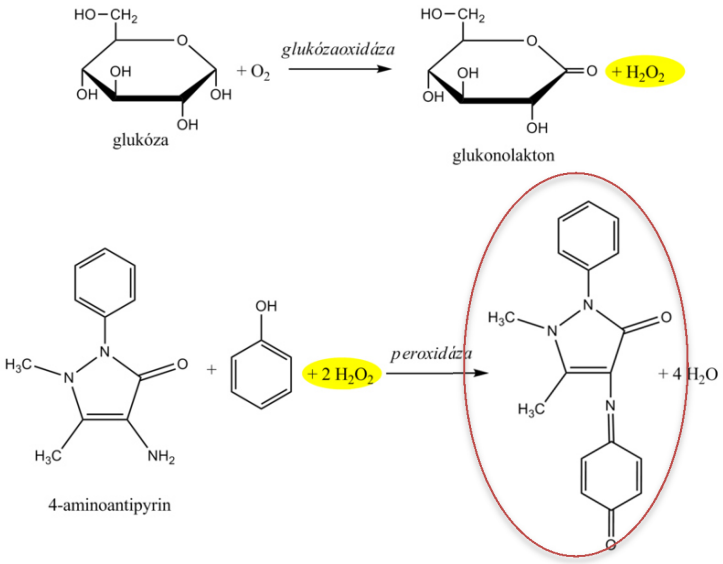
Lze použít i kinetickou metodu. Využívá se v automatických analyzátorech.

Princip:

Glukóza se oxiduje vzdušným kyslíkem za katalýzy glukosaoxidázou (GOD) na γ-lakton glukonové kyseliny a peroxid vodíku:



Vzniklý peroxid vodíku za katalýzy peroxidázou (POD) oxiduje chromogenní substrát na červeně zbarvený produkt:



Krev se odebírá po nočním lačnění a kvůli stabilizaci koncentrace glukosy do zkumavek s antiglykolytickou směsí (AGR), která obsahuje kyselý citrátový pufr pH 5,7, EDTA a fluorid sodný (NaF). EDTA a citrát působí jako antikoagulanty, enzymy na začátku glykolýzy (hexokinasa a fosfofruktokinasa) jsou inhibovány nízkým pH směsi a NaF inhibuje enolasu. Jestliže se požadují další laboratorní vyšetření, koncentrace glukosy se někdy stanovuje v séru žilní krve. V tomto případě je nezbytné včasné oddělení séra od erytrocytů.
Při dodržení předepsaných podmínek je množství produktu úměrné koncentraci glukózy v analyzovaném vzorku.

Materiál: *Činidlo-glukosa* (obsahující fenol 11 mol/l; 4-aminoantipyrin 0,77 mol/l; glukosaoxidázu 300 µkat/l; peroxidázu 18,3 µkat/l), *kalibrátor-glukóza* (koncentrace je uvedena na štítku), vzorek krevního séra a moči.

Provedení:

☞ Ke stanovení v nehemolytickém krevním séru nebo plazmě není nutná deproteinace. Do čistých, označených zkumavek se odměřuje podle schématu:

Reagencie (µl)	**Slepý pokus**	**Vzorek**	**Standard**
Činidlo-glukosa	2 000	2 000	2 000
Demi-voda	20	-	-
Sérum	-	20	-
Kalibrátor-glukosa	-	-	20
Obsah všech zkumavek dobře protřepejte. Inkubujte 30 min při laboratorní teplotě (nebo 15 min ve vodní lázni při 37 °C). Inkubační směs musí být chráněná před přímým světlem!			
Změřte absorbance* vzorků A_x a standardu A_{STD} při 495 nm proti slepému pokusu během 40 minut.			

- Odvoďte vztah pro výpočet koncentrace glukózy metodou end-point:

Odvození vztahu výpočtu koncentrace glukózy pro kinetickou metodu:

$[S] << K_M$ ... kinetika 1. řádu ... $v_0 = k*[S]$

$$v_o = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m} = \frac{V_{\max}}{K_m}[S] = k[S]^1$$

Pro koncentraci produktu platí: $\Delta c = konst * c_0$

(koncentrace produktu narůstá v čase lineárně)

Hledaná koncentrace analytu je přímo úměrná odečtu analytického signálu ve dvou časech. Totéž platí i pro standardní roztok. Mírou koncentrací je opět absorbance.

$$c_x = \frac{\Delta A_x}{\Delta A_{STD}} \times c_{STD}$$