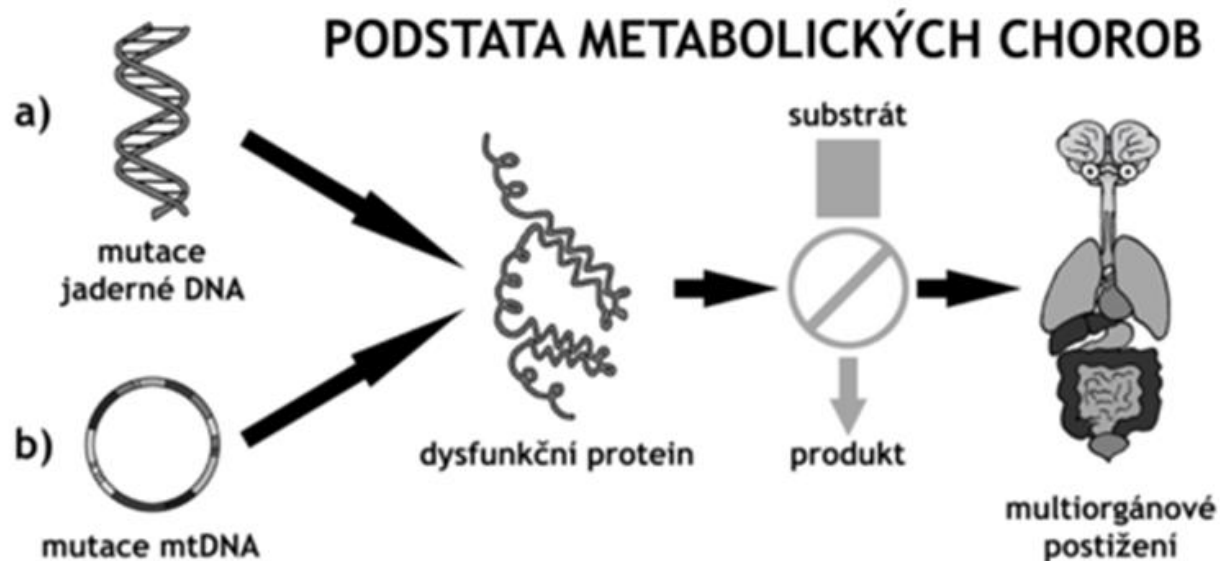


# 2. Dědičné metabolické poruchy

2.1. Příčiny a druhy poruch. Dědičné metabolické poruchy (DMP). Diagnostika. Léčba

2.2. Enzymy, regulace metabolismu.

2.3. Příčiny zvýšené aktivity buněčných enzymů v plasmě. Klinicky významné enzymy.



## 2.1. Příčiny a druhy poruch. Dědičné metabolické poruchy (DMP).

Dědičné metabolické poruchy (DMP) tvoří různorodou skupinu **700–800 onemocnění**, která jsou způsobena **enzymovým deficitem, dysfunkcí transportního proteinu či poruchou jiného proteinu** souvisejícího s některou **metabolickou dráhou**.

Typická je pro ně autozomálně recesivní, gonozomálně recesivní i dominantní, ale také mitochondriální dědičnost.

K nedostatečné tvorbě enzymu či potřebného proteinu dochází následkem mutací jaderné či mitochondriální DNA.

Konzervativní odhady kumulativní incidence všech dědičných metabolických poruch jsou uváděny kolem 1:500 (frekvence heterozygotů 1:15); je velmi pravděpodobné, že DMP jsou v současné době poddiagnostikovány.

Ačkoliv je **skupina dědičných metabolických poruch** značně **heterogenní poruchy**, je možné najít některé **společné rysy**.

1) Již z jejich podstaty vyplývá, že u pacientů budou detekovatelné **biochemické a enzymatické odchylky**.

2) Dále vzhledem k tomu, že většina metabolických drah je společná pro řadu buněk v organismu, bývá časté **multiorgánové postižení** (např. *postižení CNS, svalů, ledvin a jater u [mitochondriálních onemocnění](#)*).

3) Klinické projevy DMP bývají velmi často **nespecifické** (neprospívání, nechutenství, porucha růstu, porucha [psychomotorického vývoje](#), [poruchy vědomí](#)),

4) jen poměrně vzácně se vyskytují **specifické** známky svědčící s vysokou pravděpodobností pro některé DMP (např. zápach zpocených nohou u pacientů s izovalerovou acidurií nebo typická faciální dysmorfie u pacientů s mukopolysacharidózami či generalizovanými peroxizomálními onemocněními).

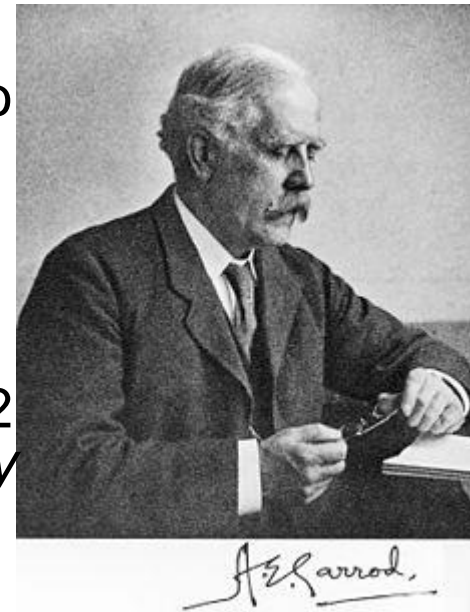
5) Postihují pacienty **jakéhokoliv věku** od prenatálního období až do stáří.

# • Historie

- Počátky objevování dědičných metabolických poruch jsou spojeny se jménem [Archibalda Garroda](#), který jako první poukázal na **souvislost lidských nemocí a Mendelových zákonů dědičnosti** a formuloval **koncept dědičných metabolických poruch**

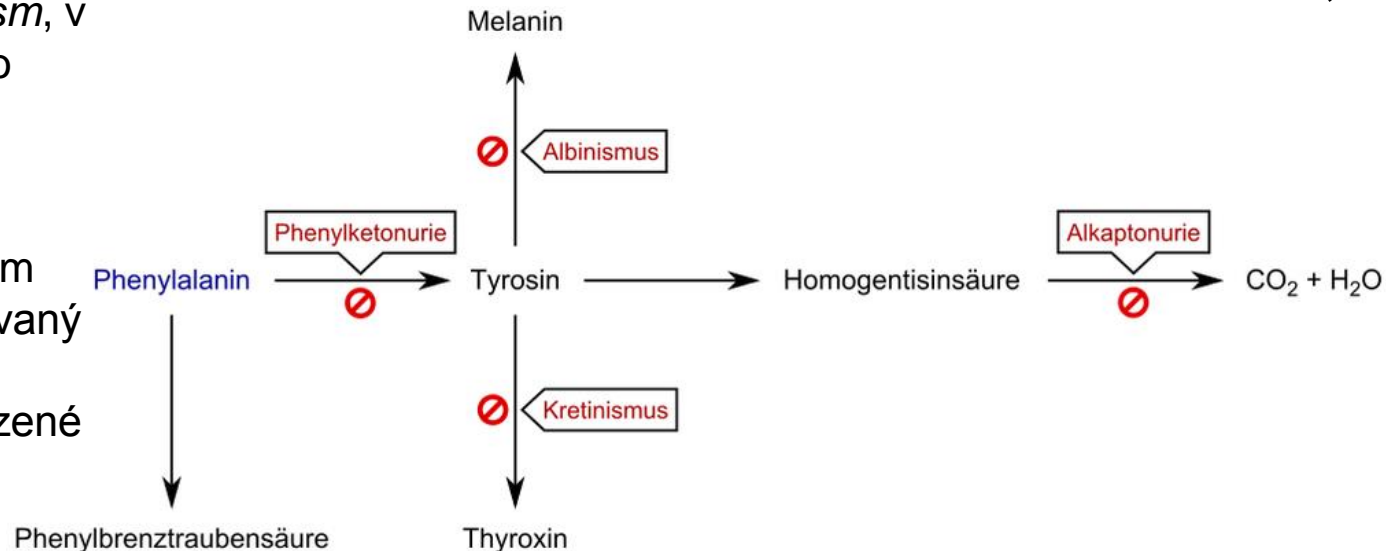
(inborn errors of metabolism).

- Garrod se zabýval studiem [alkaptonurie](#) a v roce 1902 publikoval knihu *The Incidence of Alkaptonuria: a Study in Chemical Individuality*, která je **prvním záznamem případu recesivní dědičnosti** u lidí.

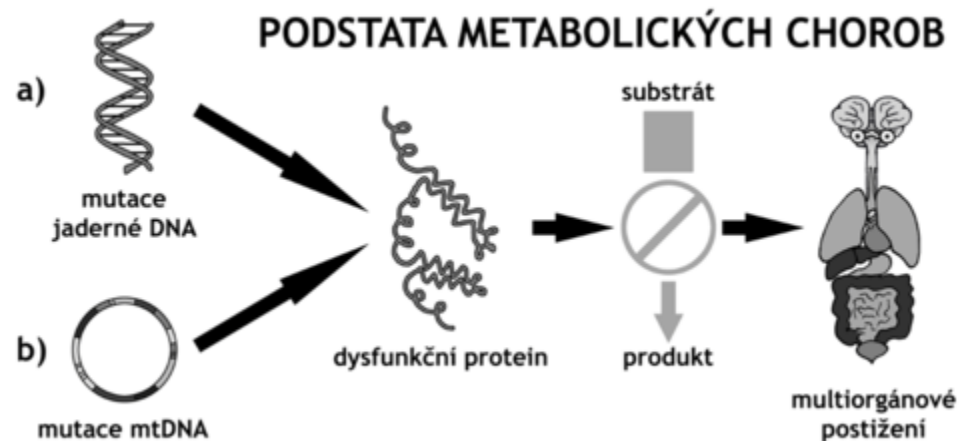


V roce 1923 vyšla další jeho kniha s názvem *Inborn Errors of Metabolism*, v níž publikoval své studie o [alkaptonurii](#), [cystinurii](#), [pentosurii](#) a [albinismu](#). Právě překladem termínu inborn errors of metabolism vznikl u nás dlouho používaný nepřesný název vrožené metabolické poruchy (vrožené metabolické vady)

Sir Archibald Edward Garrod,

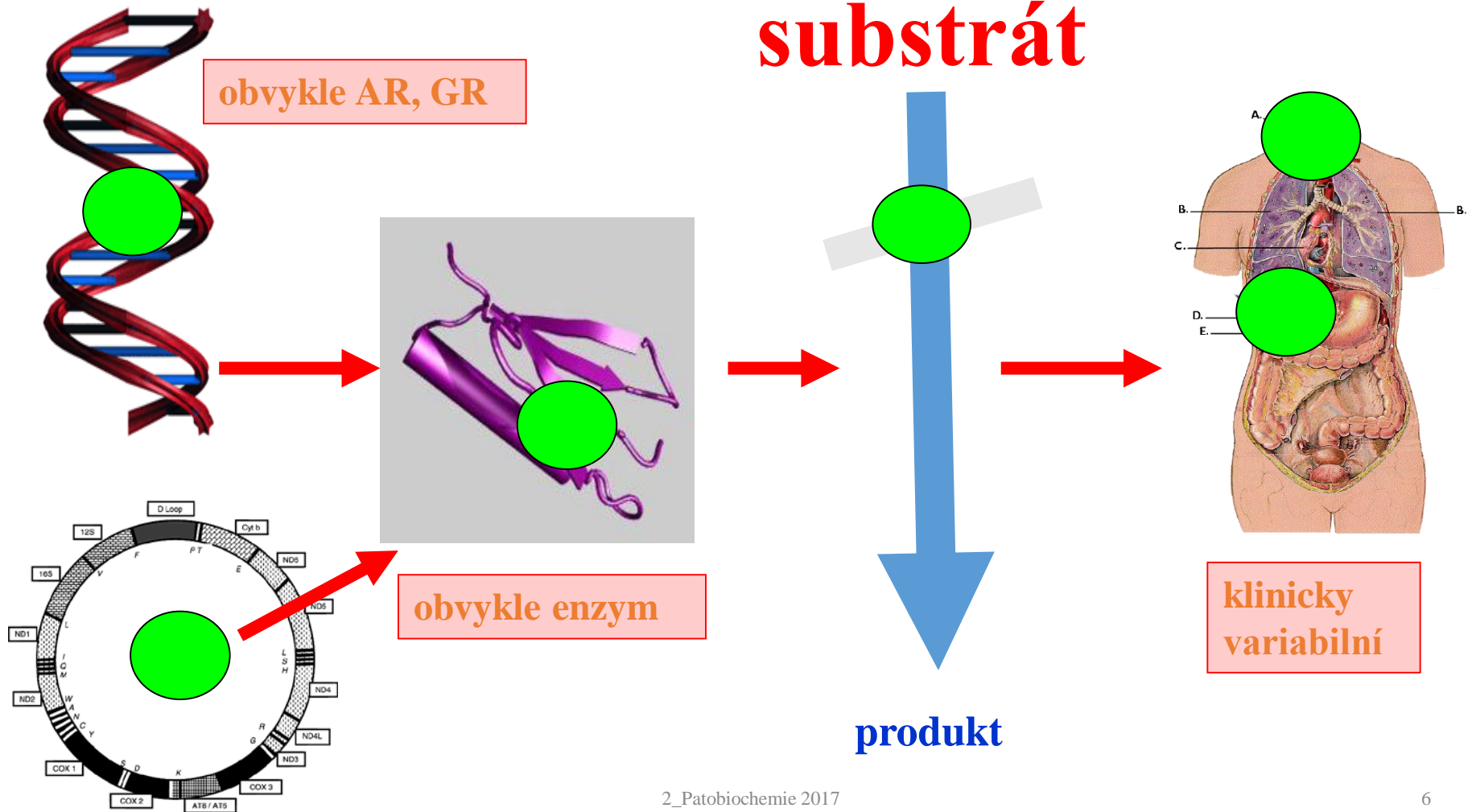


# Příčiny dědičných metabolických poruch



- Nejčastější příčinou dědičných metabolických poruch jsou **mutace nukleární DNA v zárodečných buňkách (a tím i následně v somatických buňkách)** s typickou monogenní [mendelovskou dědičností](#) — běžně **autozomálně recesivní**, gonozomálně recesivní i dominantní.
- Méně častou příčinou DMP jsou **mutace mitochondriální DNA**, které se přenášejí [maternálním](#) typem dědičnosti.
- Fenotypové projevy u dvou jedinců se stejným genotypem se mohou lišit v důsledku **dalších faktorů** jako je **vliv prostředí** (dieta, životní styl u [nemocí malých molekul](#)) či jako jsou např. [epigenetické změny](#), [epistáze](#) (interakce s alelickými variantami v jiných genech), [inaktivace X-chromozomu](#) (lyonizace).
- **Mutace** mohou být typu **bodových mutací (missense, nonsense, synonymní mutace), delecí a inzercí (s nebo bez posunu čtecího rámce)**, přičemž z typu mutace a její lokalizace nelze často přímo určit stupeň postižení funkce příslušného proteinu.

# Dědičné metabolické poruchy



# Důsledky mutace

Důsledkem mutace může být

- **změněné množství translatovaného proteinu** (obvykle snížené či vzácně zvýšené)
- **změněné vlastnosti proteinů** (změnou izolované funkce jedné domény, nebo globální změnou všech funkcí např. při misfoldingu).
- Mutace mohou vést i ke změnám funkce **neproteinových genových produktů** jako jsou například miRNA či siRNA, které regulují expresi řady cílových genů.

**Postiženým proteinem** je většinou **enzym (ENZYMOPATIE)** některé metabolické dráhy, jež potom vázne a nevzniká její produkt, který může **chybět**, neodčerpává se substrát, který se může **hromadit**, případně metabolizovat na **vedlejší produkt**. Od toho se pak odvíjí postižení různých orgánů do různé míry.

**Další proteiny: strukturní, transportní, regulační**

# Důsledky mutací

- **hromadění substrátu** (malé molekuly-př. phenylalanin jsou difusně rozptýlené v tělesných tekutinách, přestup přes filtr. bariéru ledvin, exkrece močí. Velké molekuly -př. mukopolysachyridy hromadění v místě vzniku).

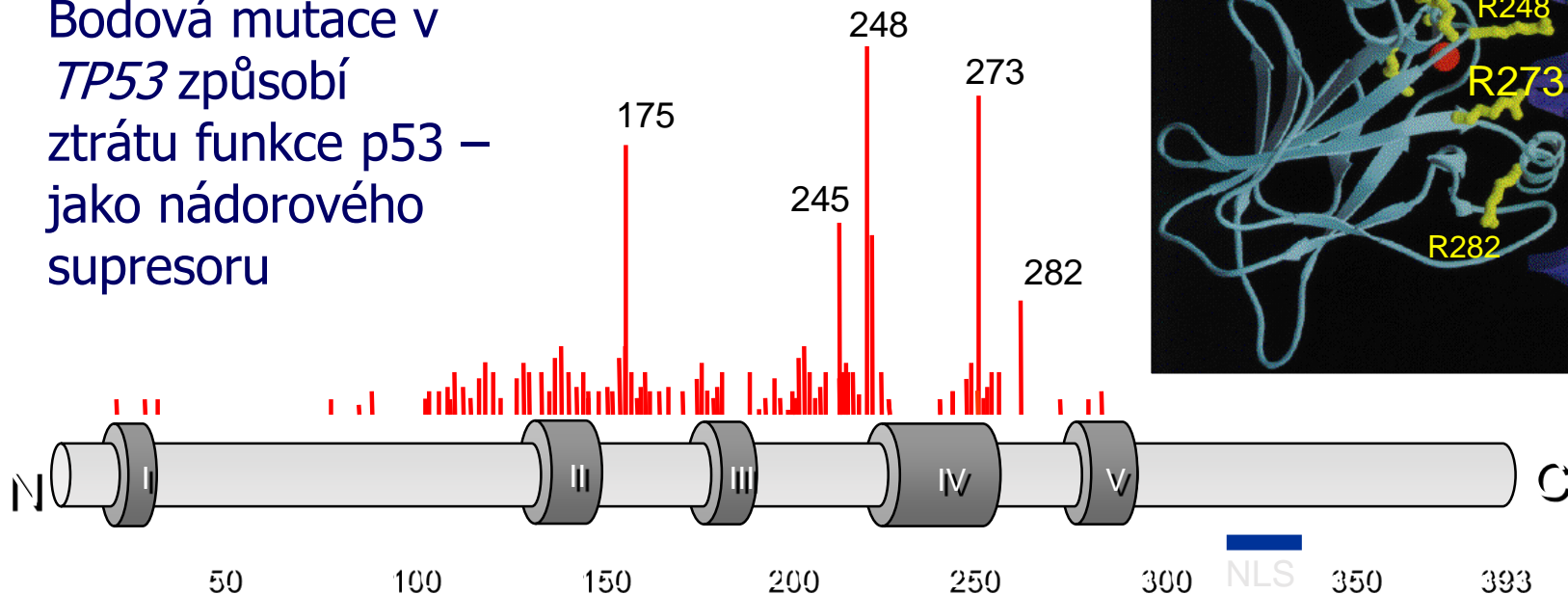
**Př = PKU** - mutace genu pro PAH (***phenylalaninhydroxylasu***), aktivita enzymu < 1% (postiž.2 alely). Nízké procento PKU je způsobeno mutací 1 alely nebo v genu pro kofaktor PAH – tetrahydrobiopterin (lehčí forma PKU).

- **chybění produktu**
- **hromadění defektního enzymu**
- **tvorba nesprávného produktu** - blok metabolické dráhy
- **ztráta mnohočetných enzymových aktivit**



# Mutace *TP53*

Bodová mutace v *TP53* způsobí ztrátu funkce p53 – jako nádorového supresoru



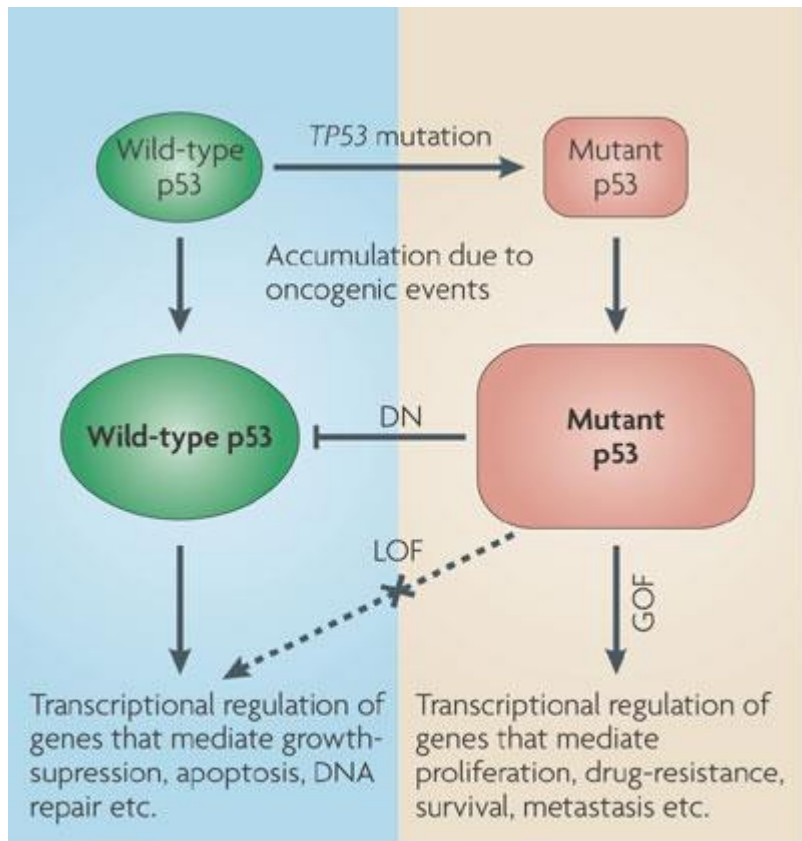
## • Důsledky mutace pro funkce proteinu

- ztráta funkce
- zesílení funkce – mutací zesílí některá z funkcí proteinu nebo intenzitu produkce proteinu /hromadění)
- získání nové funkce
- nesprávná exprese proteinu ( v místě a čase)

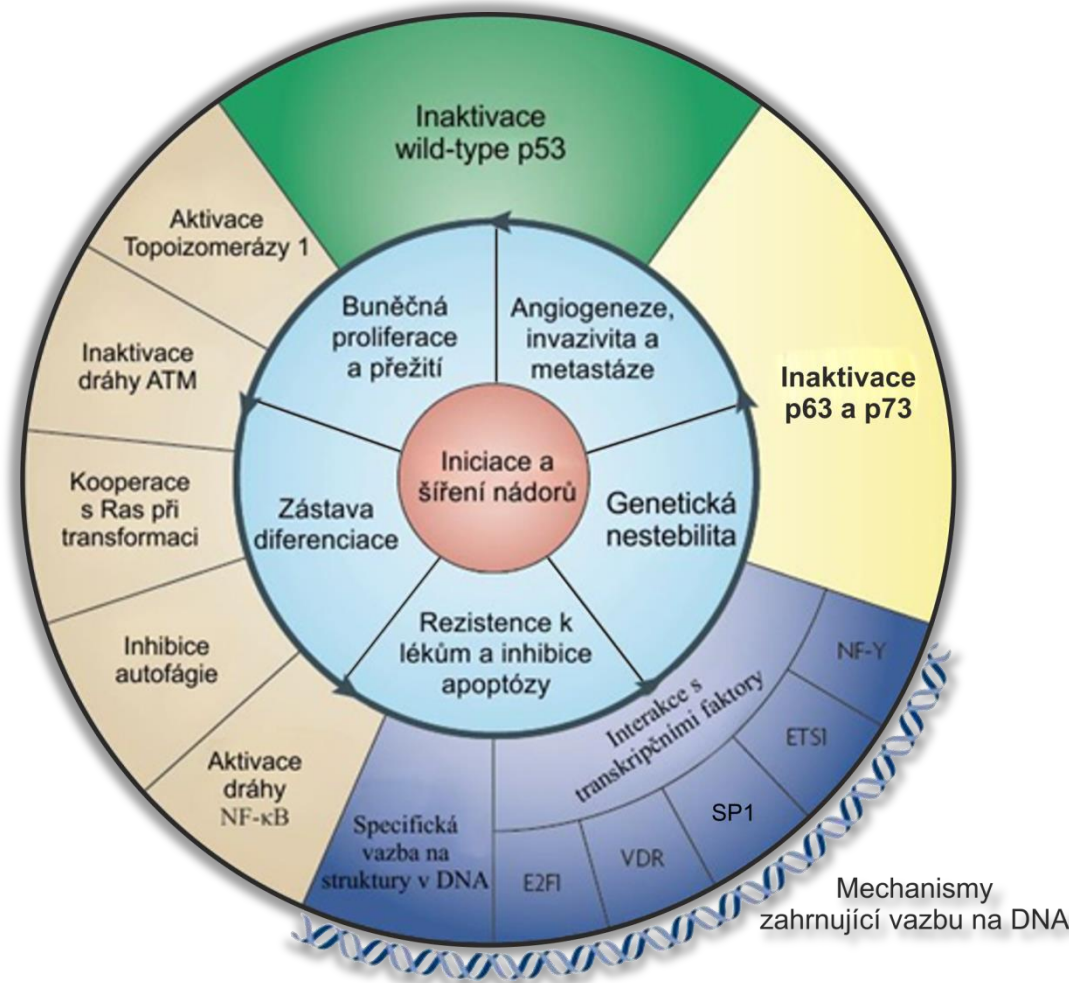
PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy

TEST

# Funkční dopad mutací *TP53* a mechanismy GOF



Nature Reviews | Cancer



Mechanismy zahrnující vazbu na DNA

p53- nádorová supresor, antionkogen, transkripční faktor, protein vázající se na DNA  
 mutantní p53- onkogen

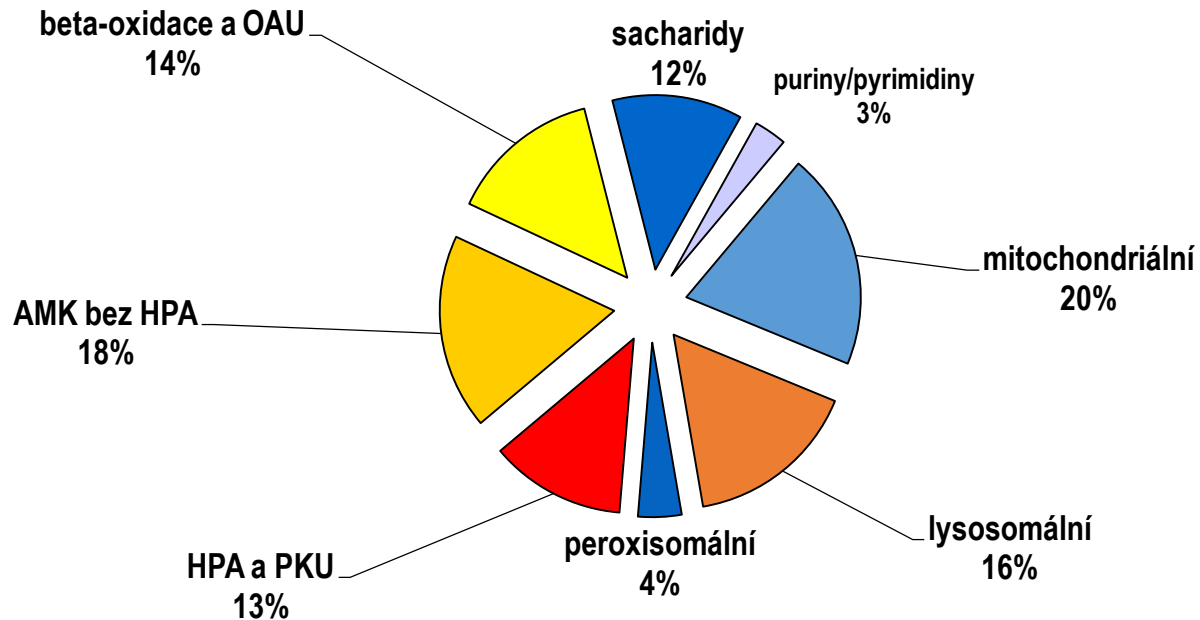
# Incidence (výskyt) DMP

- Individuální výskyt poměrně vzácný (1:15 000 – 200 000)
- Kolektivní výskyt vysoký (1: 1000), incidence pravděpodobně i vyšší (kolem 1:500)
- novorozenecký screening 1:1000-1:4000
- selektivní screening nejméně 1:500-1:1000
- frekvence heterozygotů pro DMP nejméně 1:15
- zastoupení se liší podle populací
  - vyšší výskyt v imbredních populacích (PKU Turecko, organické acidurie Blízký Východ)
  - tyrosinemie I.typu Quebec
  - aspartylglykosaminurie Finsko
  - lysosomální nemoci Izrael

Konzervativní odhady [kumulativní incidence](#) všech dědičných metabolických poruch jsou uváděny kolem 1:500 (frekvence heterozygotů 1:15); je velmi pravděpodobné, že DMP jsou v současné době poddiagnostikovány.

**Incidence**, statistický ukazatel v [epidemiologii](#), je podíl počtu nově hlášených nemocných jedinců za dané časové období (nových případů) a počtu všech jedinců ve sledované [populaci](#).

# Výskyt DMP v ČR



ČR, 2005, n=127

**incidence pro ČR ~ 1:1000**  
**dosud ~150 různých nosologických jednotek**

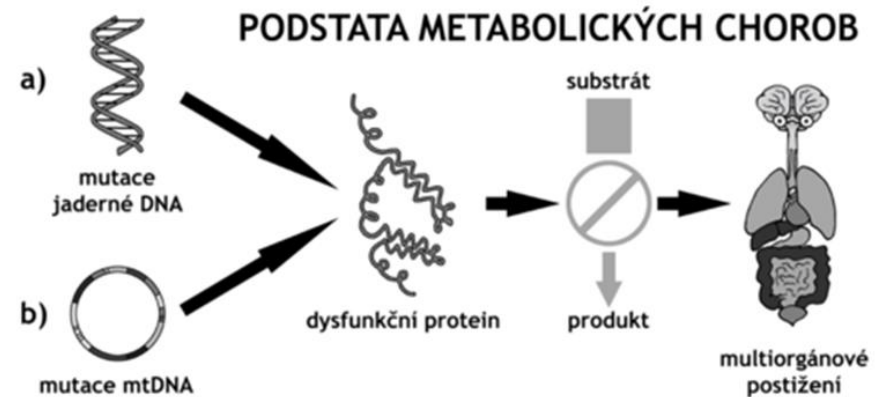
# Způsoby přenosu DPM (dědičnost)

## JADERNÁ DNA

- Autosomálně recesivní
- Autosomálně dominantní
- Gonosomálně dominantní
- Gonosomálně recesivní

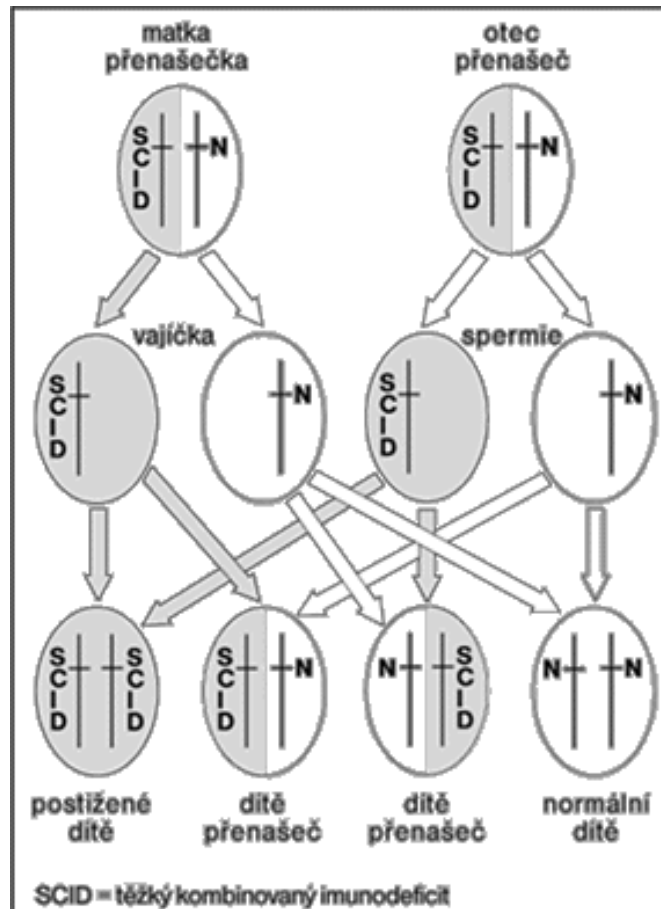
## MIMOJADERNÁ DNA

- Maternální typ dědičnosti ( mitochondriální DNA)



# Dědičnost AR (Autosomálně recesivní)

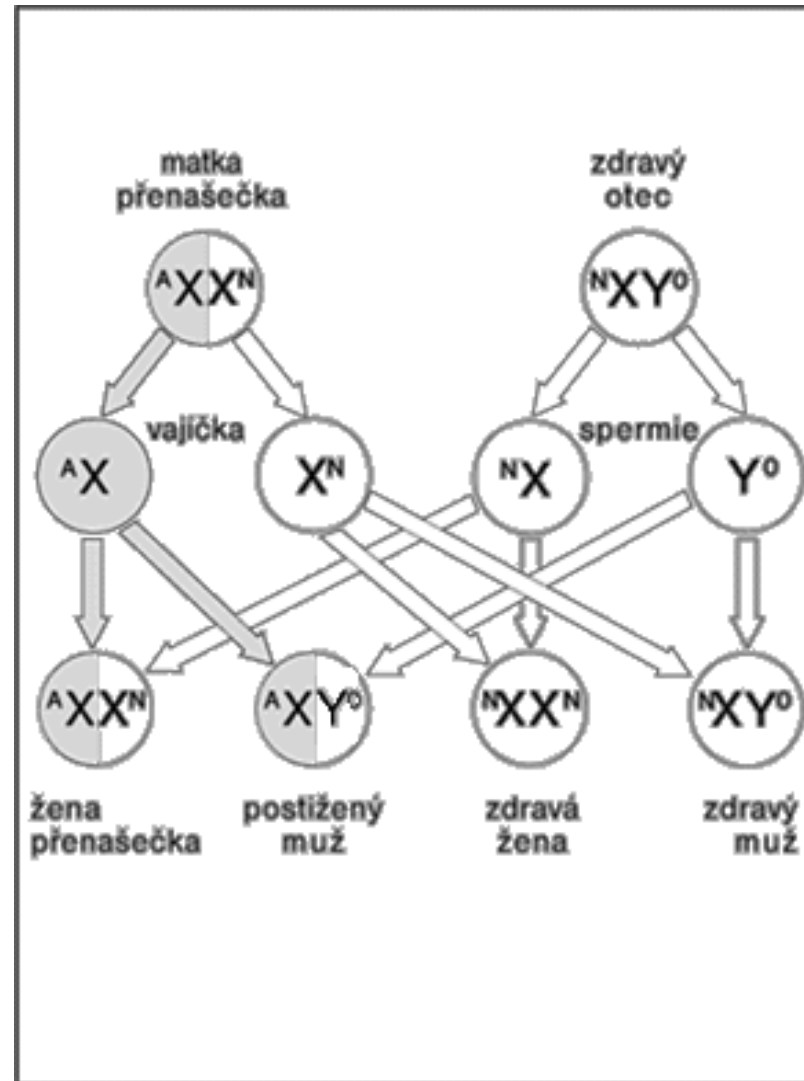
- Dědí se tak naprostá většina DPM např. PKU
- Onemocnění se projeví pouze u homozygota ( nositel obou defektních alel pro daný znak)
- **Heterozygot** je klinicky zdravý jedinec, je přenašečem defektního genu



# Dědičnost GR (Gonosomálně recesivní)

- Abnormní gen recesivního typu je vázán na **pohlavní chromozom X**
- **Klinicky se projeví jen u mužů**  
(mají jeden X chromozom, ženy mají XX)
- Je-li postižen jeden z rodičů, pak jsou
  - muži buď zdraví, nebo trpí chorobou
  - **ženy mohou být z 50% přenašečky**

Příklady:  
mukopolysacharidóza  
Hunterova, glykogenóza typ VIII



# Maternální typ dědičnosti

- Přestože mitochondriální DNA (mtDNA) má zanedbatelný objem proti jaderné DNA, mutace v mtDNA mohou způsobit závažné choroby

1) Veškeré mitochondrie zdědí každý jedinec výhradně **po matce** ( mitochondrie zygoty jsou totiž všechny původem z vajíčka, všechny mitochondrie spermie zanikají).

2) V každé buňce je okolo **1000 mitochondrií** - jedna mitochondrie s mutovanou mtDNA tudíž na buňku nemá žádný vliv. Zda se mutace v mtDNA nějakým způsobem projeví na úrovni buňky nebo celého organismu závisí na tom, **kolik procent mitochondrií** má mutovanou genetickou informaci.



# Dělení DMP dle postižené metabolické dráhy

- Dědičné metabolické poruchy typicky zahrnují poruchy metabolismu:
- **poruchy metabolismu organel**
  - [mitochondriální onemocnění](#)
  - [peroxizomální onemocnění](#)
  - [lysozomální onemocnění](#)
  - [poruchy glykosylace](#) (vázané na endoplazmatické retikulum)
- **poruchy metabolismu primárně nevázané na organely**
  - [poruchy metabolismu aminokyselin](#)
  - [organické acidurie](#)
  - [poruchy metabolismu sacharidů](#) včetně glykogenóz
  - [poruchy metabolismu purinů a pyrimidinů](#)
  - [poruchy metabolismu lipidů](#)
  - [porfyrie](#)
- jiné DMP

# Klasifikace DMP

1. Podle rychlosti nástupu klinických příznaků
2. Podle jednotlivých metabolických systémů
3. Podle subcelulární lokalizace změněného proteinu
4. Podle typu molekul
5. Podle analytické metodiky používané pro průkaz DPM

# 1. Podle rychlosti nástupu klinických příznaků – onemocnění:

- **akutní** metabolická
- s intermitentním průběhem
- **chronické**

# 2. Podle jednotlivých metabolických systémů – poruchy metabolismu

- **aminokyselin**
- **sacharidů**
- **lipidů**
- **purinů a pyrimidinů**
- **vysokomolekulárních látek**
- **barviv atd.**

### **3. Podle subcelulární lokalizace změněného proteinu :**

- **cytosolové**
- **mitochondriální**
- **lysozomální**
- **peroxisomální**
- **Golgiho aparátu**
- **iontových kanálů atd.**

### **4. Typ molekul:**

- **nemoci malých molekul**
- **nemoci komplexních molekul**

# 1) Klinika DMP

- **Projevy** – v kterémkoliv věku od narození až do dospělosti
- **Manifestace** – pestrá, od mírných chronicky probíhajících forem až po akutní život ohrožující stavy
- **Závažnost** se odvíjí od stupně postižení změněného proteinu ( např. aktivita enzymu 0-20%)

## Klinické příznaky DMP

- **Nespecifické** – těch je většina (poruchy svalového napětí, poruchy chování, poruchy vědomí, křeče, neprospívání, zvracení, postižení funkce srdce, svalů, jater, ledvin...
- **Specifické** – např. typický abnormální zápach moče, potu...,ektopie čočky a trombembolické příhody

# Laboratorní nespecifické nálezy

- Acidóza ( např. laktátová při deficitu PDH)
- Alkalóza ( např. deficit OTC- ornitinkarbamoyltransferáza)
- Hypoglykémie
- Hyperamonémie
- Hypoketóza (s hypoglykemií u poruch  $\beta$ oxidace)
- Hyperketóza (u některých org. acidurií)
- Hypourikémie/hyperurikémie (porucha met.purinů)
- Hypocholesterolémie/hypercholesterolémie (deficit 7-dehydrocholesterolu tzv. Smith-Lemli-Opitzův sy)

# 1\_1. Akutní metabolická onemocnění

- **Začátek:** obvykle v časném novorozeneckém či raném kojeneckém období
- **Projevy:** respirační selhání, sepse, křeče, poruchy vědomí, protrahovaná žloutenka, rozvíjející se RDS či DIC atd.
- **Příklady:** poruchy metabolismu AMK, galaktózy, ureageneze, organických kyselin,  $\beta$  oxidace mastných kyselin

# 1\_2. Metabolická onemocnění s chronickým průběhem

- **Charakteristika:** střídání bezpříznakových období s atakami, které se typicky objevují po zátěži např. změna výživy (bílkovinná zátěž), horečnaté období (zvýšená energetická potřeba organismu v průběhu katabolismu)...
- **Příklady:** pozdní formy deficitu OTC (ornitinkarbamoyltransferáza -porucha močovinového cyklu), některé poruchy  $\beta$  oxidace MK



# 1\_3. Chronicky progredující metabolická onemocnění

- **Charakteristika:** zpočátku normální psychomotorický vývoj se po určitém období zastavuje případně dochází k jeho regresi
- **Příklady:** střádavá onemocnění (mukopolysacharidózy, neurodegenerativní onemocnění...)

# 4) Dělení DMP podle projevů DMP

Zásadní rozdíl v **povaze metabolitů, které způsobují klinické projevy onemocnění**, umožňuje dědičné metabolické poruchy rozdělit do dvou skupin:

- **nemoci malých molekul**
- **nemoci komplexních molekul**

Fenotypové projevy u dvou jedinců se stejným genotypem se mohou lišit v důsledku **dalších faktorů** jako je vliv prostředí (dieta, životní styl u nemocí malých molekul) či jako jsou např. epigenetické změny, epistáze (interakce s alelickými variantami v jiných genech), inaktivace X-chromozomu (lyonizace).

# 4\_1\_Nemoci malých molekul

jsou způsobeny

- hromaděním malých toxických molekul (**amoniak, organické kyseliny**)
- **nedostatkem** žádoucích metabolitů (**ketolátky, glukóza**), které vznikají katabolismem látek přijímaných potravou (aminokyseliny bílkovin, sacharidy, mastné kyseliny).
- 1) Typicky se **onemocnění manifestuje** v **novorozeneckém věku v průběhu několika hodin či dnů**, k nevyvážené koncentraci toxických molekul dojde **po zvýšeném přísunu zdroje v potravě či při horečnatých infektech**, a to atakovitě, jako akutní stav **se změnou chování až přechodem do kómatu** (např. *hypoketotické kóma u deficitu MCAD-Deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (MCAD)*).
- Ataky se mohou dostavit opakovaně, ve spojení se specifickou situací, se kterou si ji pacient spojuje (*dlouhé hladovění* nebo naopak *náhlé přejídání*).

-  
2) Některá onemocnění se ovšem mohou od tohoto schématu lišit a mívají i subakutní či chronickou formu a postihují i jiné orgány než jen CNS.

## 4\_2\_Nemoci komplexních molekul

- **Nemoci velkých molekul** vznikají **defektem v metabolismu** (porucha tvorby, transportu látek, ale také v jejich odbourávání) **endogenně tvořených makromolekul** (**glykosaminoglykany, glykolipidy, glykoproteiny a jiné**).
- Některé tyto látky tvoří stavební části buněčných membrán, což se pak projeví defektem tohoto typu, jiné jsou **odbourávány** v **peroxisomech a lysozomech**, v nichž se pak mohou hromadit. **To trvá řádově měsíce až roky, nemoc probíhá bez atak** a zřejmých krátkodobých nutričních či infekčních souvislostí, má **chronický charakter**, který se manifestuje až po uběhnutí latentní fáze, během níž se nahromadilo dostatek makromolekul, aby se defekt projevil na úrovni funkce.
- Nemoci, při nichž se **hromadí makromolekuly v peroxisomech či lysosomech**, mohou imitovat **neurodegenerativní** či nádorová onemocnění.
- Nemoci, při nichž dochází k membránovým defektům, zase **chromozomové aberace**, a to příznaky jako organomegalie, dysmorfie hlavy a obličeje, postižení CNS a jiných orgánů.

# Příklady nejznámějších DMP

- Poruchy metabolismu AMK
- Organické acidurie
- Poruchy metabolismu sacharidů
- Poruchy metabolismu lipoproteinů
- Poruchy metabolismu purinů a pyrimidinů
- Poruchy metabolismu vysokomol. látek

# Diagnostika DMP

**Laboratorní diagnostika DMP** - na několika úrovních:

- **Prenatální diagnostika** - vyšetření ke zjištění, zda je plod postižen DMP, která byla prokázána v rodině - jen odůvodněné případy (AFP, vada v rodině)
- **Postnatální diagnostika** - *novorozenecký screening* (PKU hypothyreosa aj.)

**Většinu DMP lze diagnostikovat prenatálně** -

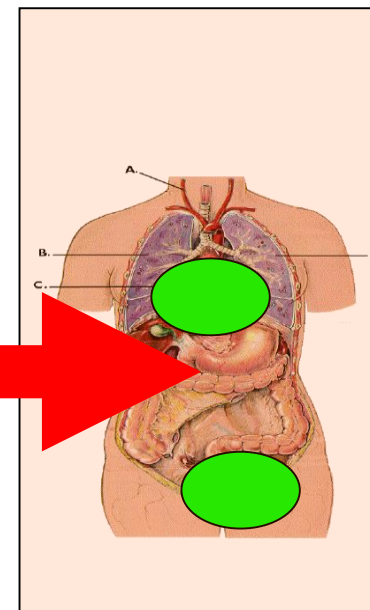
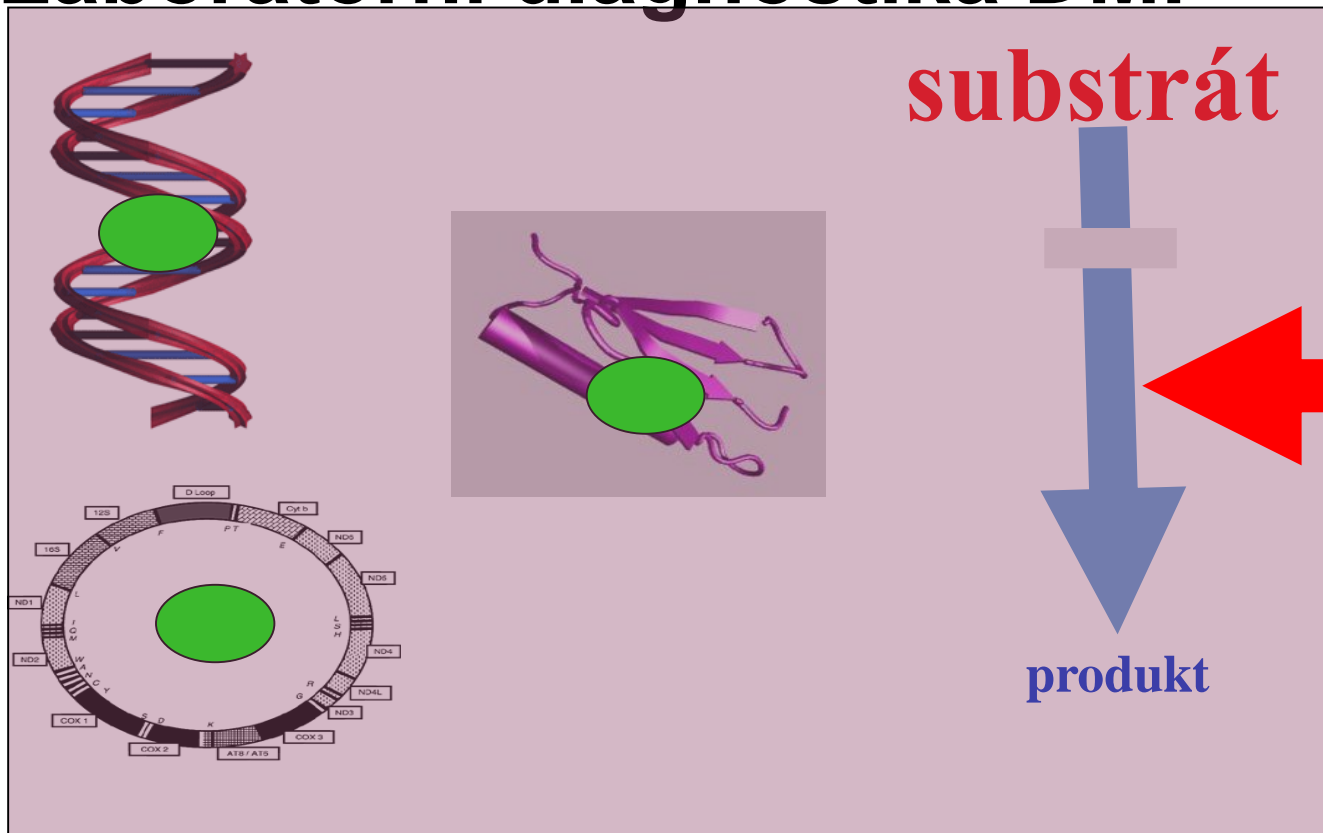
analýzou enzymové aktivity nebo mutací v choriových klcích či amniocytech, nebo vyšetřením metabolitů v plodové vodě.

- Včasná diagnostika – **léčba, kompenzace**

Metabolická příručka, Laboratorní příručka Diagnostických laboratoří  
Ústavu dědičných metabolických poruch

VFN a 1. LF UK - [udmp.lf1.cuni.cz/file/5673/Metabolická%20příručka%20verze%2002.pdf](http://udmp.lf1.cuni.cz/file/5673/Metabolická%20příručka%20verze%2002.pdf)

# Laboratorní diagnostika DMP



**DNA/RNA**

**Enzymologie**

**Metabolity**

## Příznaky

specifické-např.

zápach

barva moči

nespecifické-např.

koma

PMR

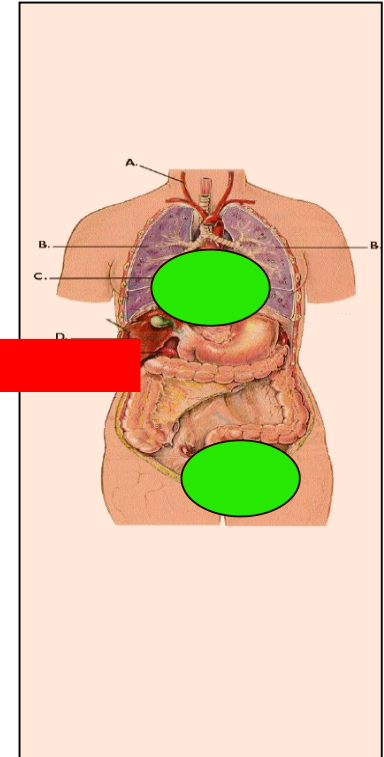
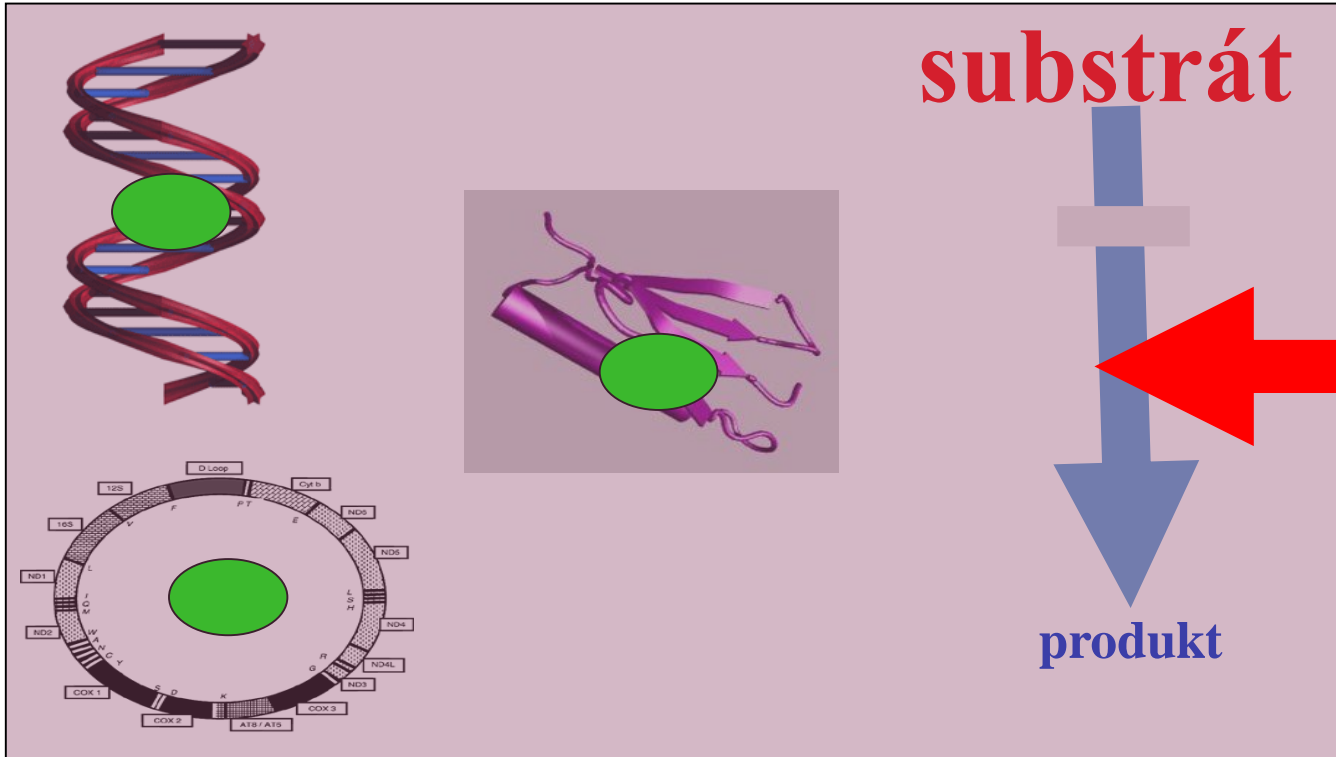
dysmorfie

hepato/myopathie

další

1. na úrovni metabolitů
2. na úrovni enzymů
3. na molekulární úrovni

# Diagnostika symptomatická



## DNA/RNA

screening  
scanning  
sekvenování

## Enzymologie

leuko/lymfo  
fibro  
sval

## Metabolyty

analyt  
profil analytů  
moč/krev/likvor

## Příznaky

specifické  
nespecifické

koma

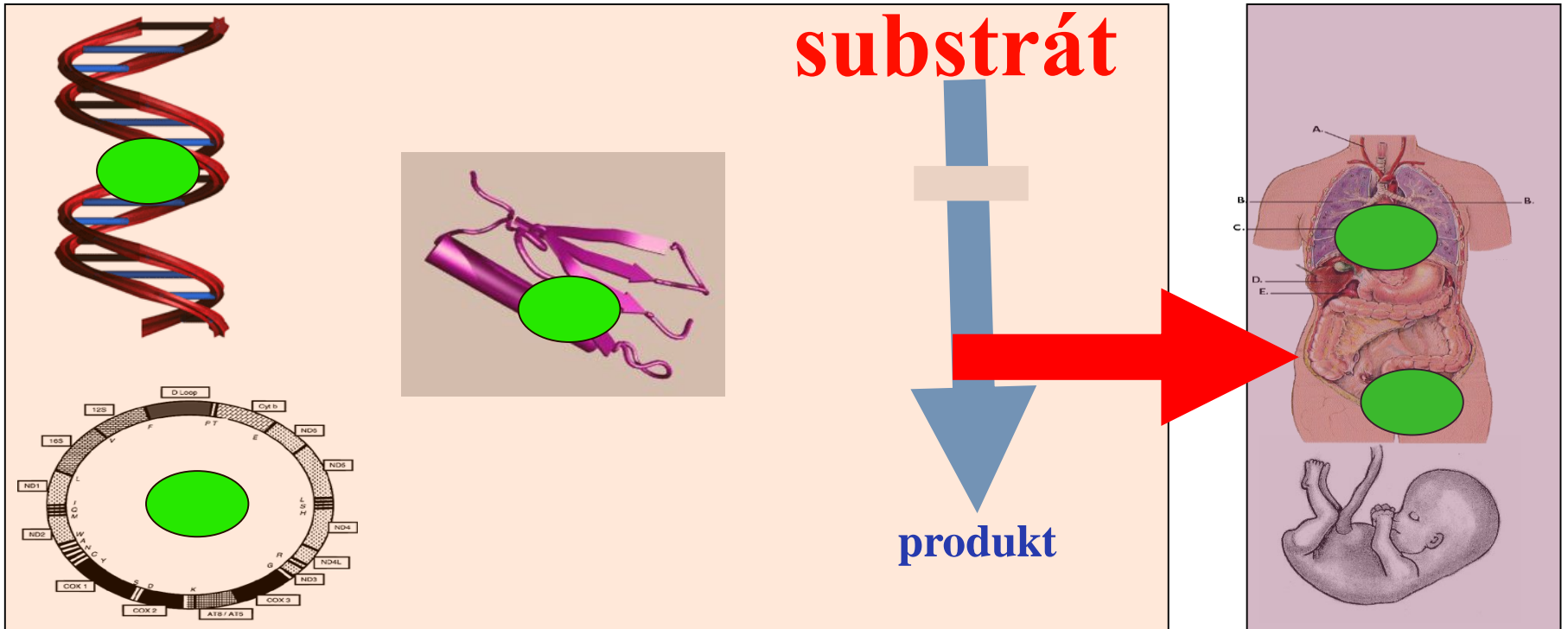
PMR

dysmorfie

hepato/myopathie



# Diagnostika presymptomatická



vyšetření příbuzných s rizikem DMP  
prenatální diagnostika

screening segmentu populace

novorozenecký screening

**jedna nemoc nebo skupina  
předem známých nemocí**

# Základní situace s rozdílnou diagnostikou pro DMP

## • DMP malé molekuly

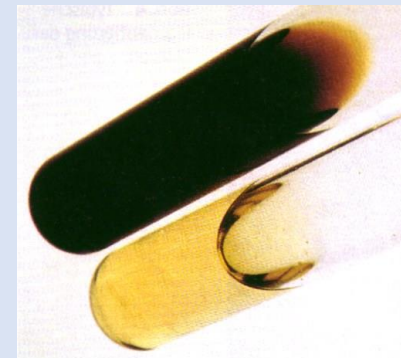
- akutně nemocný novorozenec
- (opakovaná) ataka dlouhotrvajícího bezvědomí
- neprospívání kojence
- hypoglykémie

## • DMP velké molekuly

- progredující postižení CNS a svalstva
- dysmorfie obličeje
- organomegalie (játra, slezina, srdce)

# Abnormální zápach a barva moči

- zápach (malé těkavé molekuly):
  - z pocené nohy-isovalerát
  - karamel/javorový sirup-oxokyseliny
  - vařené zelí-methionin oxid
  - rybina-trimethylamin
  - černý rybíz- některé organické kyseliny
  - myšina-fenylacetát
- zbarvení
  - červenooranžové-uráty
  - černohnědé při oxidaci-homogentisát
  - modré-indoxalové deriváty
  - zelené-4-OH-butyrát

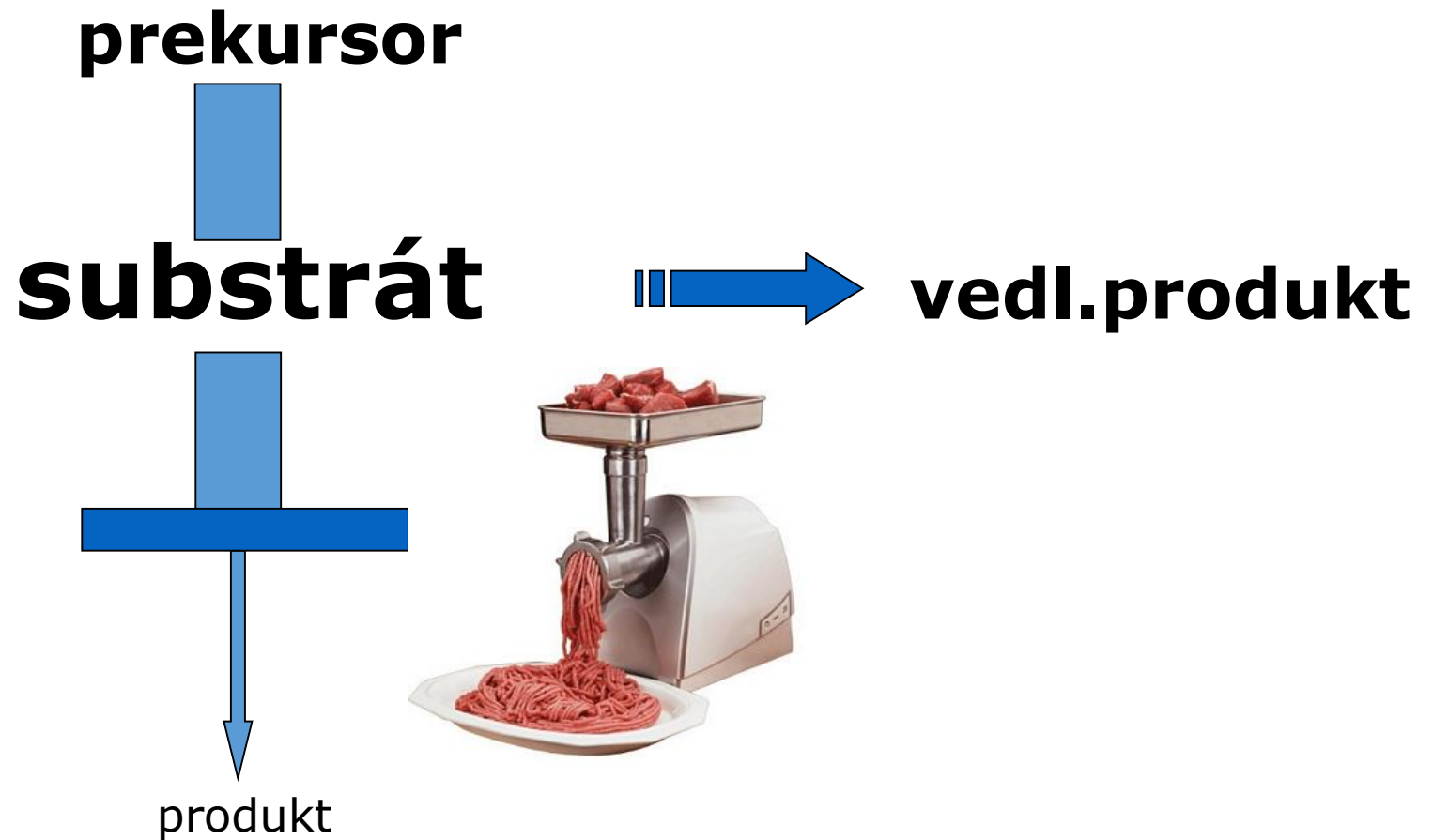


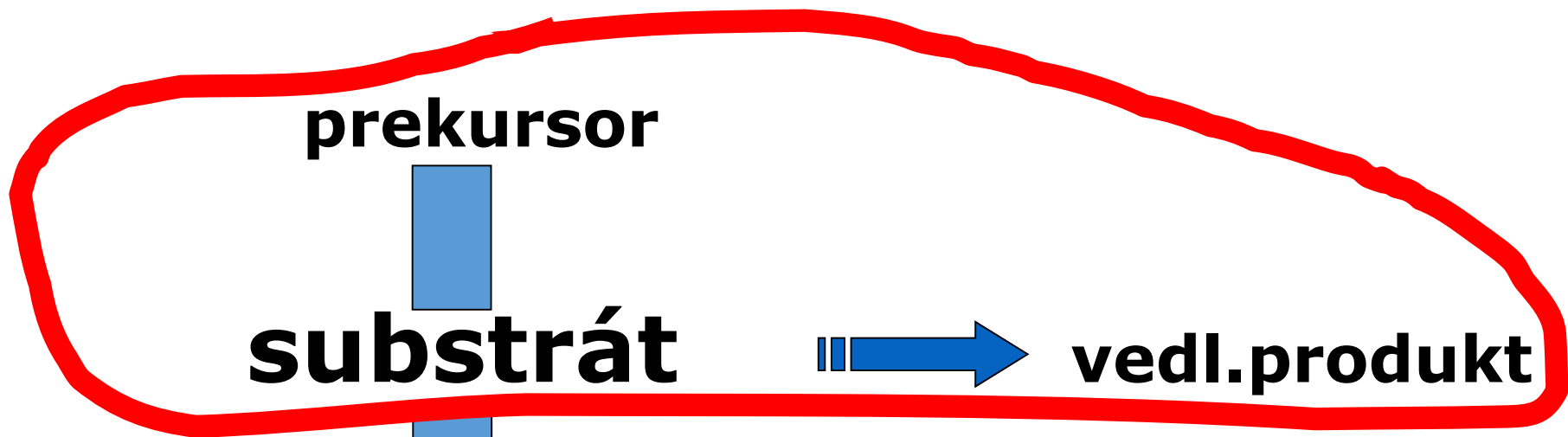
# 1. Diagnostika na úrovni metabolitů (biochemické vyšetření)

- **Charakteristika:** prokazujeme změněnou koncentraci nějakého metabolitu ( substrát, produkt, abnormní metabolit).

***Nejstarší,nejjednodušší,nejrozšířenější.***

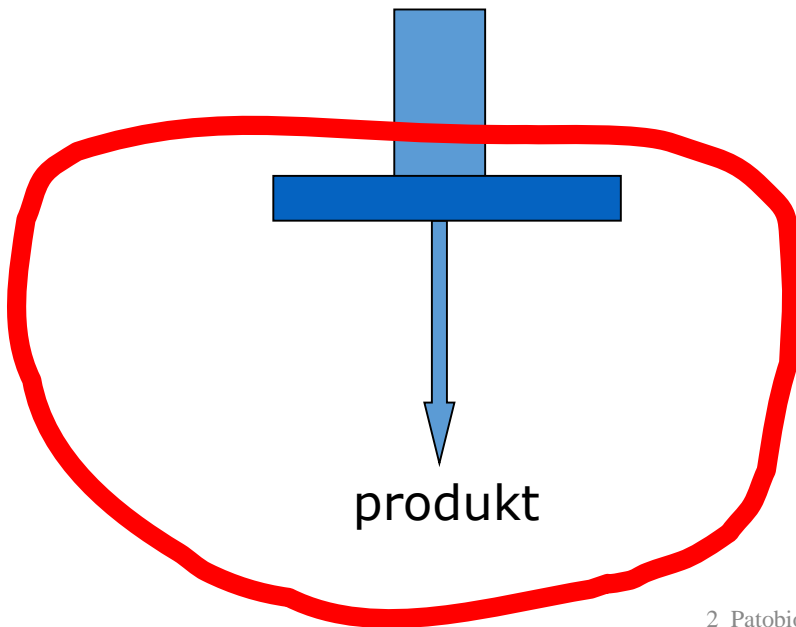
- **Užití:** všude tam, kde defektním proteinem je enzym či transportní protein → v místě metabolického bloku **dochází k hromadění substrátu a nedostatku produktu, případně k tvorbě jiných metabolitů** v důsledku aktivace alternativních metabolických drah
- **Materiál:** sérum či plazma, moč, likvor, plná krev v podobě suché krevní skvrny na filtračním papírku





Příklady:

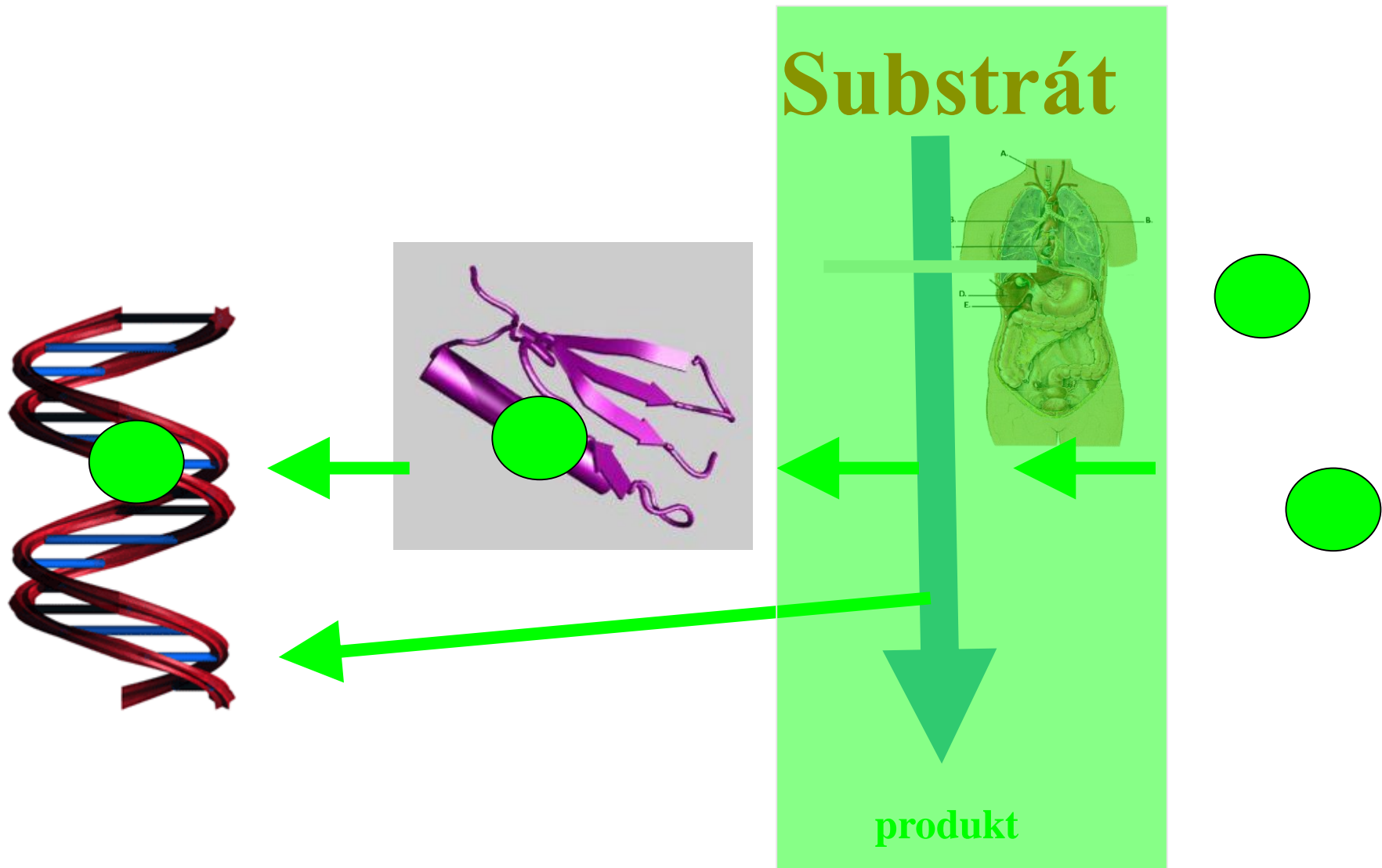
- Phe a Phe-deriváty
- amoniak
- cystin u cystinosy
- cystin u cystinurie
- mukopolysacharidy



### Příklady:

- glukosa u GSD
- ketolátky u poruch beta.oxidace MK
- plasmalogeny u peroxisom.poruch
- cystein u deficitu CBS
- AdoMet u RM
- ATP u mitochondriálních nemocí

# DMP- diagnostika metabolitů





# 1. Diagnostika na úrovni metabolitů – pokračování – vyšetřovací metody

- **Vyšetřované metabolity:** AMK, sacharidy, oligosacharidy, glykosaminoglykany, puriny, pyrimidiny, lipidy, steroidy atd.

- **Používané laboratorní techniky:**

chromatografie - papírová

- tenkovrstvá

- kapalinová (iontoměničová, vysokoúčinná HPLC)

- plynová (s hmotnostní spektrometrií GC/MS )

elektromigrační techniky

- elektroforéza

- kapilární elektroforéza

**tandemová hmotnostní spektrometrie MS/MS**

# Běžné laboratorní nálezy u DMP

## Krev

- glykemie
- cholesterol
- TG
- kys.močová
- MAc
- hyperamonemie, RAlk
- ALT, AST
- CK
- anemie/pancytopenie

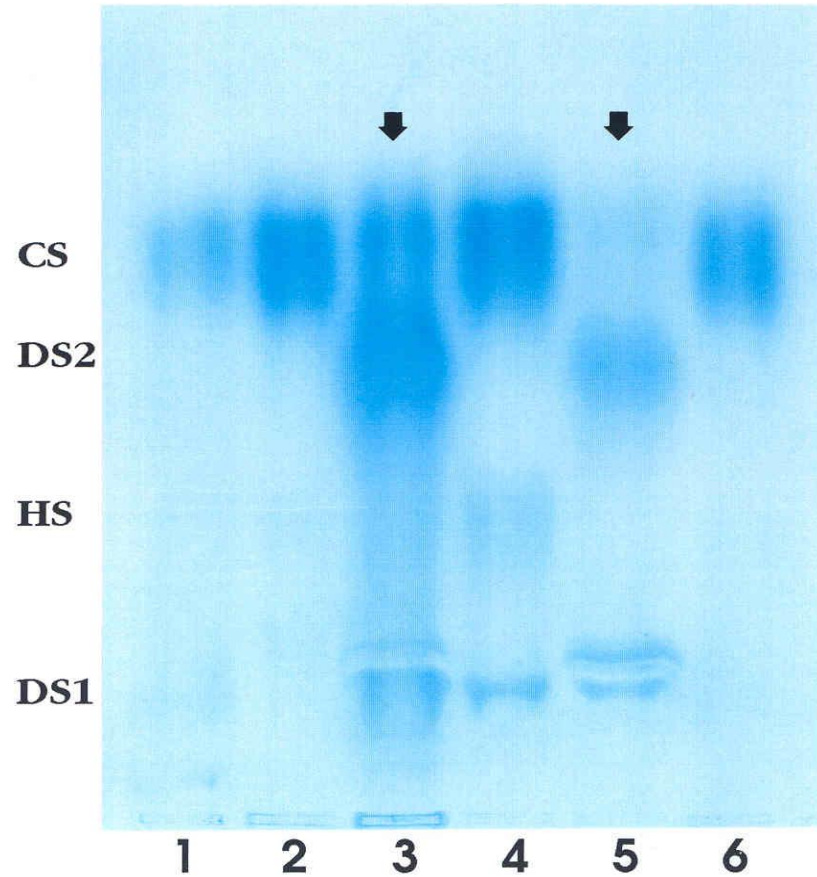
## Moč

- ketolátky
- kys.močová
- krystalurie
- myoglobinurie

# MPS I – Hurlerova choroba (deficit $\alpha$ –iduronidasy)



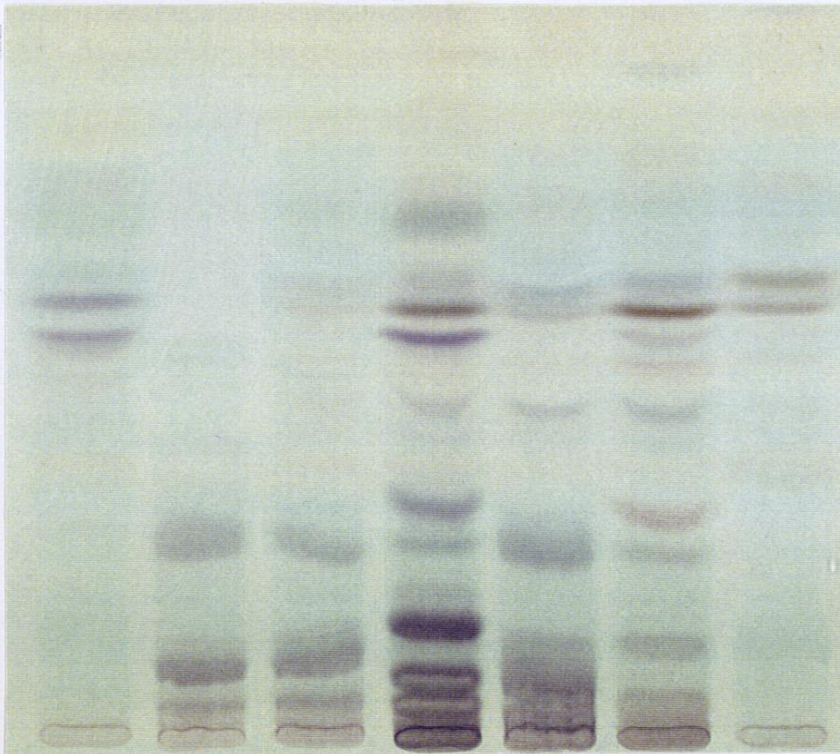
MPS I in a 6-year-old girl



Electrophoresis of urinary GAGs  
(*excretion of dermatan sulphate/DS and heparan sulphate/HS*)

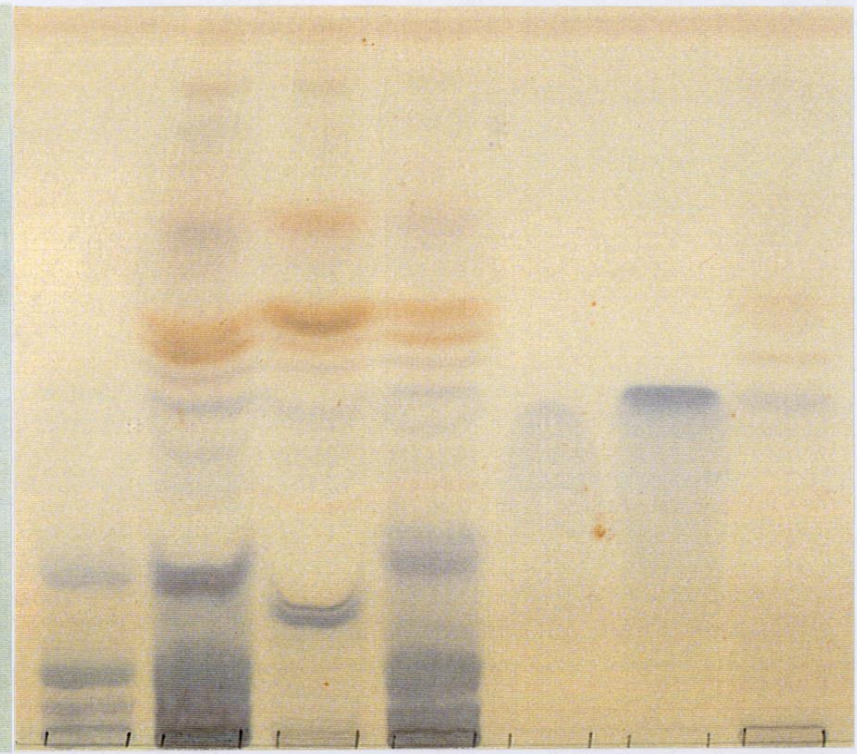
# Glykoproteinosy – HPTLC oligosacharidů v moči

ORCINOL



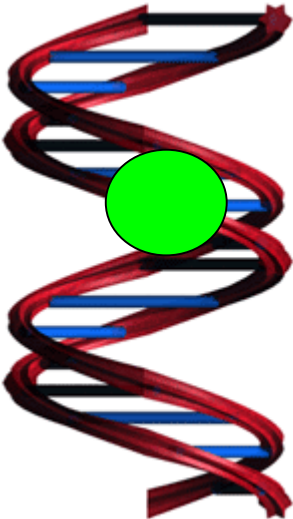
KO Sial P1 GM1 P2 Fuc KO

RESORCINOL



Sial P2 Sch P1 NANA KO

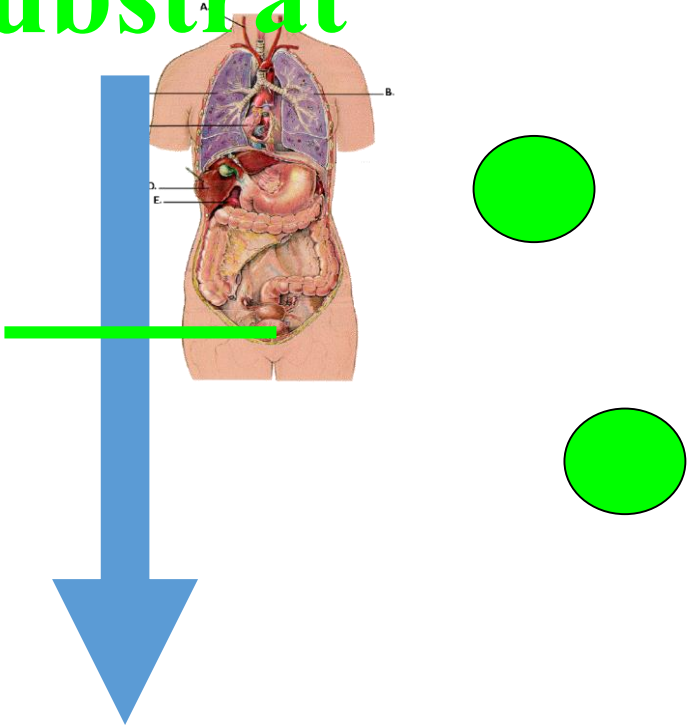
# Diagnostika DMP - enzymů



enzym

2\_Patobiochemie 2017

Substrát



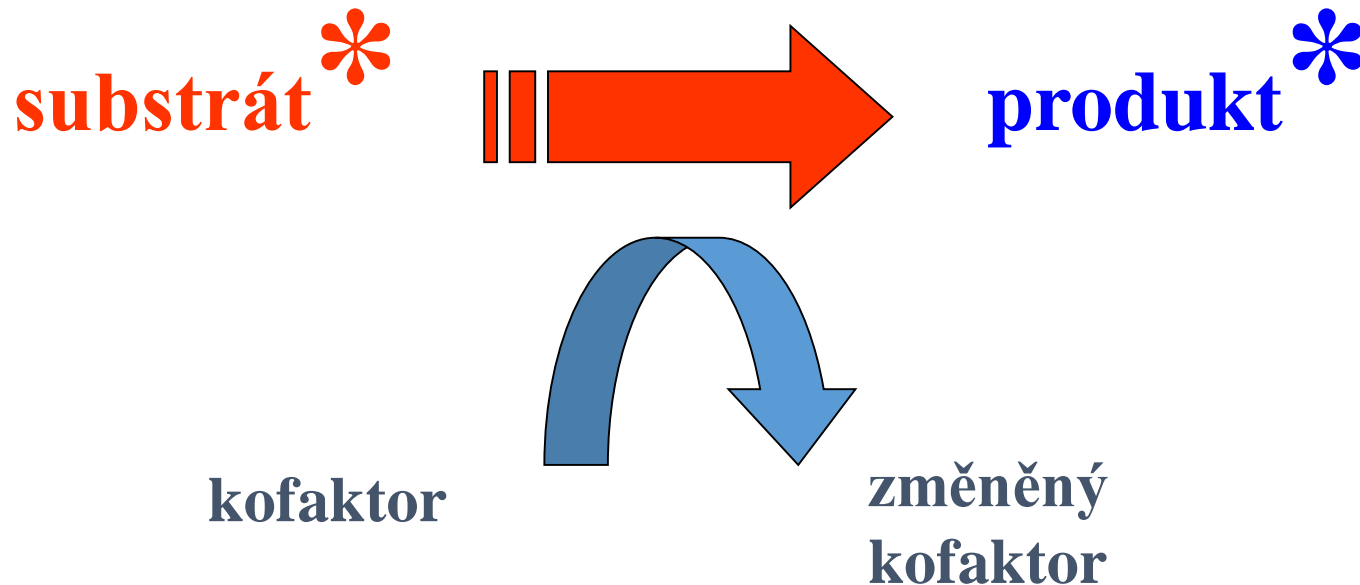
produkt

## 2. Diagnostika na úrovni enzymů

- **Charakteristika:** prokazujeme sníženou aktivitu postiženého enzymu. Vyšetření je náročnější (ekonomicky nákladnější, často větší zátěž pro pacienta – odběr materiálu).
- **Užití:** v prenatální diagnostice, pro potvrzení příslušné DPM, obvykle mu předchází vyšetření na úrovni metabolitů
- **Materiál:** leukocyty, erytrocyty a trombocyty izolované z periferní krve, sérum nebo plazma, kultura kožních fibroblastů, tkáň ze svalové či jaterní biopsie

# Principy enzymologického vyšetření

- separace **substrátu** a **produktu**
- kvantifikace přírůstku či úbytku



- kvantifikace přírůstku či úbytku

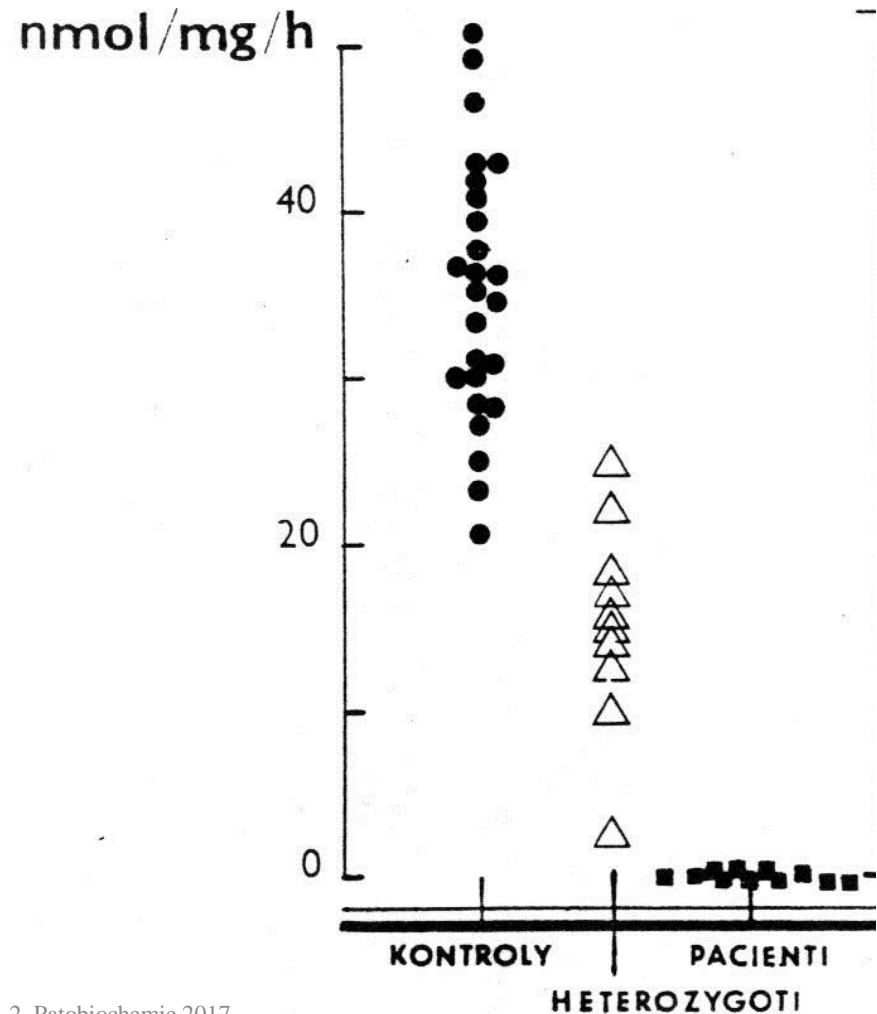
# Stanovení enzymů u DMP

- **Obvykle nutné buňky**
- **Leukocyty, fibroblasty**
- **Tkáně plodu a obalů plodu**
- **Techniky fluorimetrické a radiometrické (event. fotometrické)**
- **Měřený parametr: úbytek substrátu nebo tvorba produktu**



# Typické výsledky enzymologie

- Postižení homozygoti jasně deficitní
- Heterozygoti: překryv
- Zdraví homozygoti: obvykle normální rozdělení aktivity v populaci

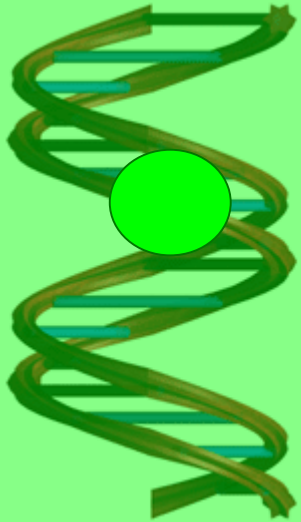


# Množství enzymu

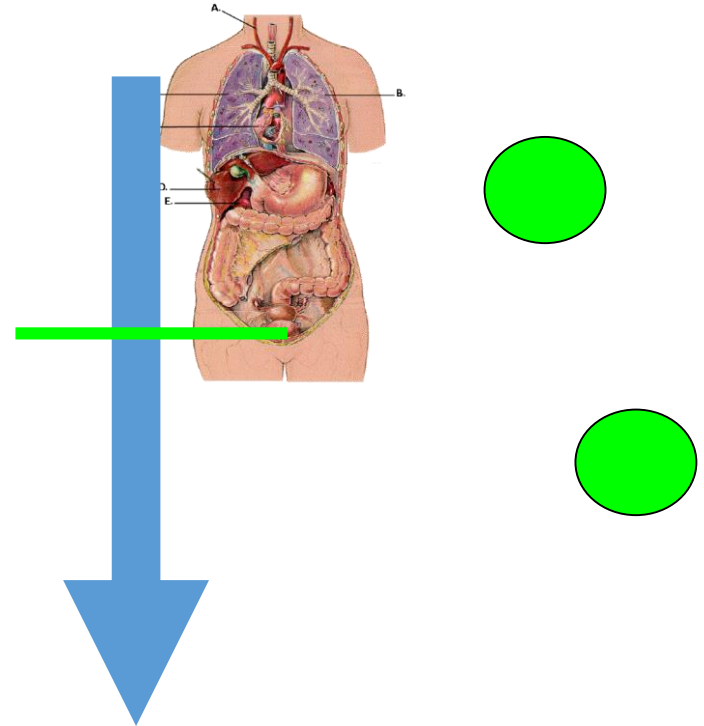
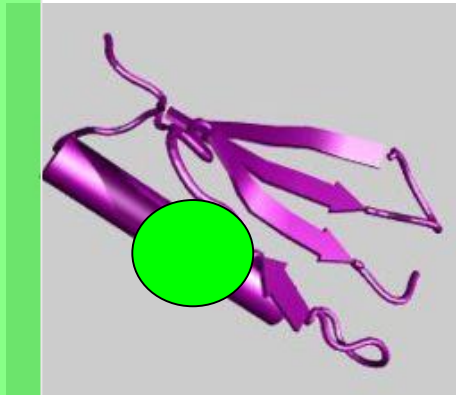
- **katalytická koncentrace enzymu, enzymová aktivita**
- Katal – množství enzymu, které katalizuje přeměnu 1 mol substrátu za 1s, za definovaných podmínek (T, pH, nasycení mol. Enz S)
- mkatal/l (na 1 L vyšetřované tekutiny)
- dříve mezinárodní jednotka U/IU (
- přeměna 1mmol S za 1min)
- mkatal/l = 60 U/l
- **Imunochemické stanovení enzymů**
- Specifická protilátka, neměří aktivitu enzymu
- mg/l

# Molekulární diagnostika DMP

DNA



Substrát

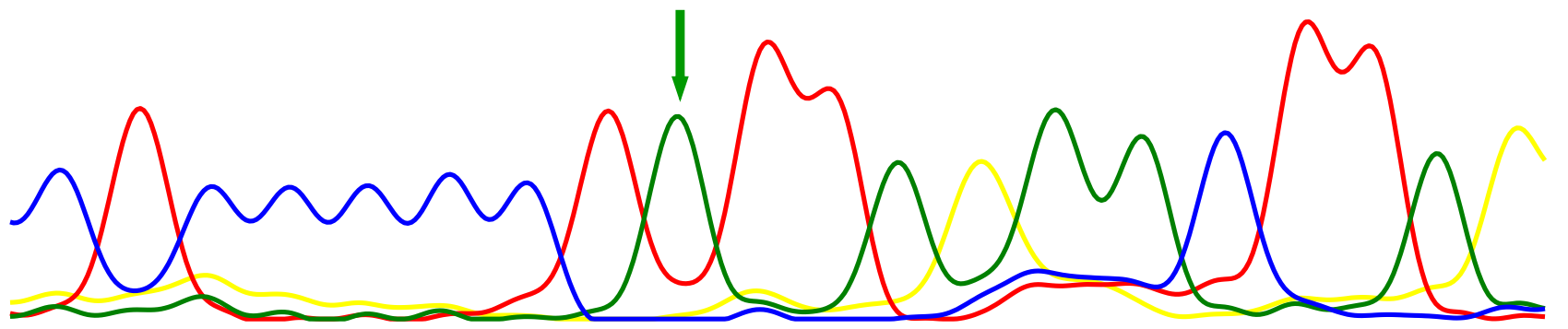
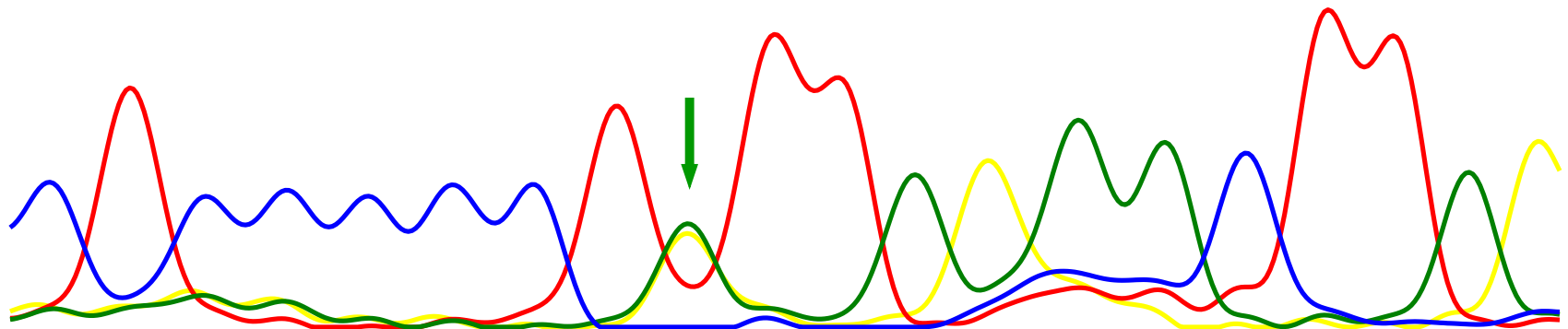
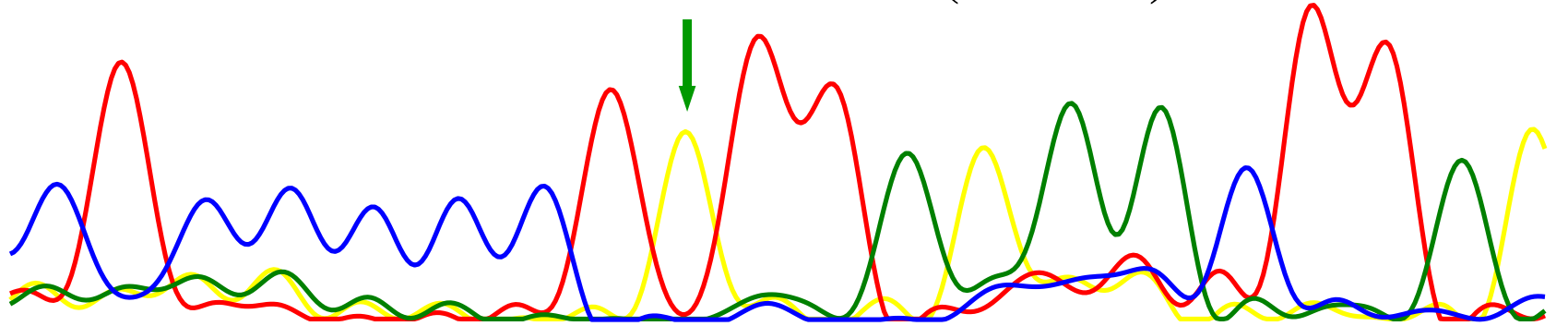


produkt

# 3. Diagnostika na molekulární úrovni

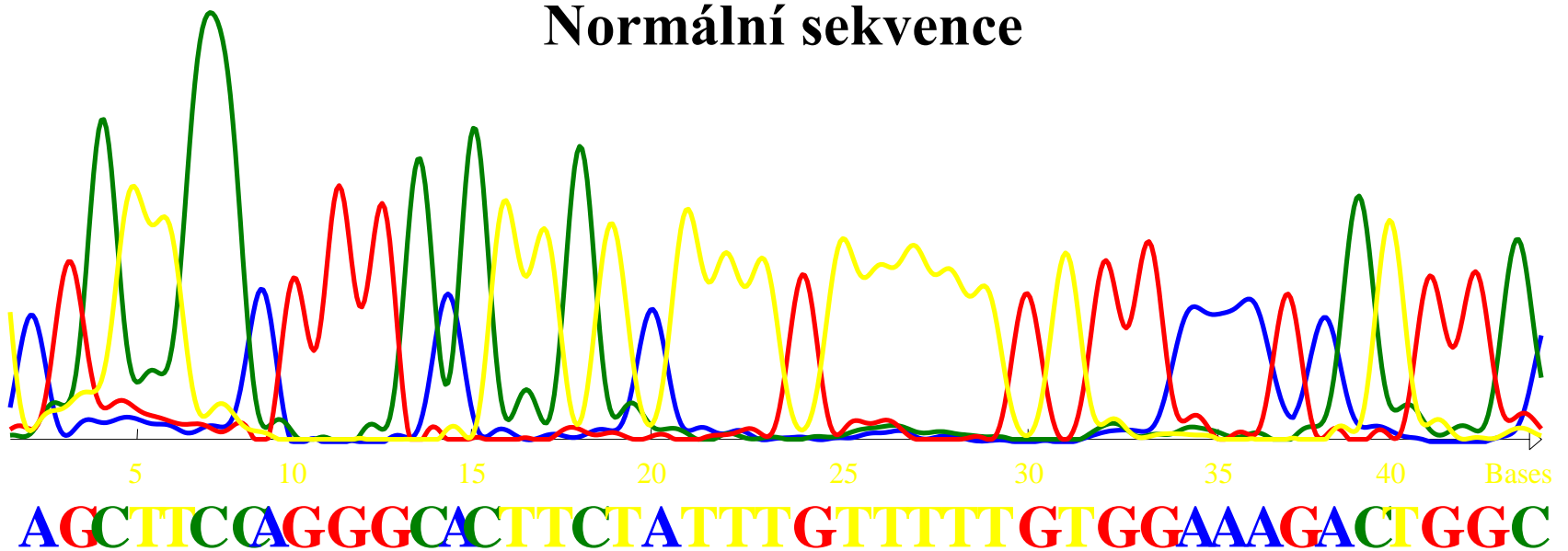
- **Charakteristika:** diagnostika na úrovni DNA prokazuje přímo defektní gen. Ekonomicky nejnákladnější, indikovat uvážlivě
- **Užití:** k definitivnímu potvrzení diagnózy tam, kde tak nelze jednoznačně učinit na základě vyšetření metabolitů či enzymů, dále v genetickém poradenství
- **Materiál:** leukocyty z periferní krve, buňky z plodové vody získané amniocentézou, buňky choriových klků získané biopsií placenty

# OTC: Mutace c. 829 C>T (R277W)

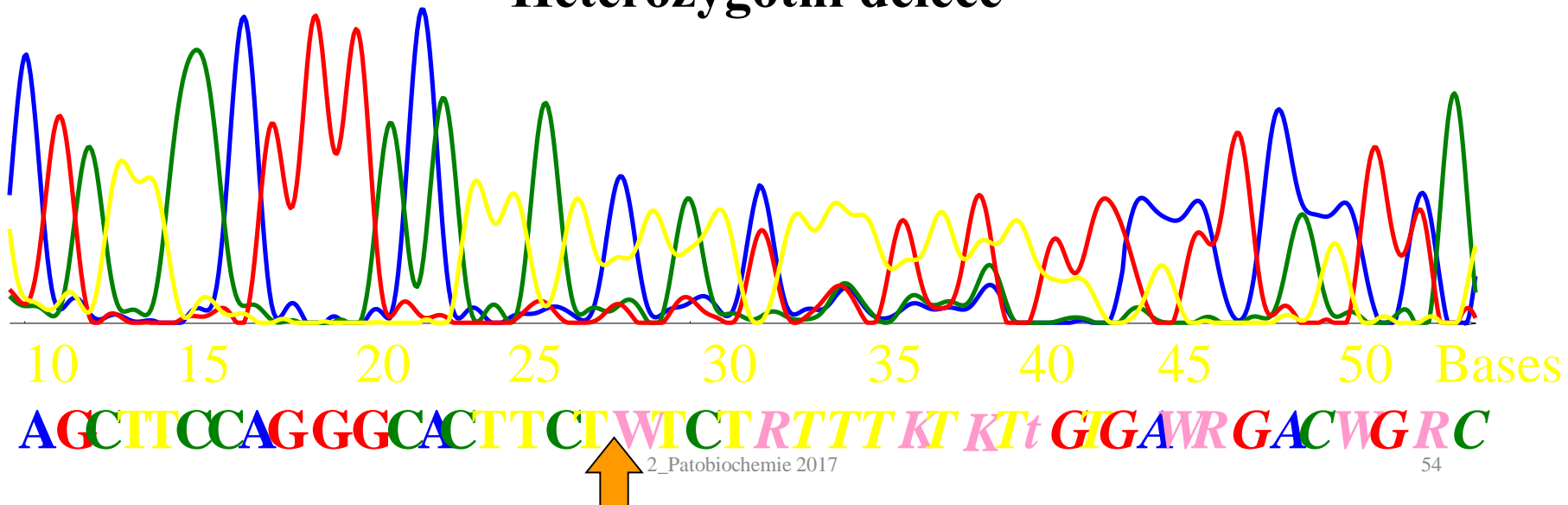


A G A A A A A G T / C C G C T C C A G G C T

## Normální sekvence



## Heterozygotní delece



# Screening

- **Screening** = metoda vyhledávání časných forem nemocí nebo odchylek od normy v dané populaci formou testů
- provádí se u všech novorozenců narozených na území ČR
  - rychlá diagnostika a hlavně včasná léčba dědičných metabolických poruch
  - **potvrzení / vyvrácení onemocnění** ještě před jeho projevy a poškozením dítěte

Metoda odběru kapky krve z patičky na novorozeneckou screeningovou kartičku



**Novorozenecký screening (NS)** je aktivní a celoplošné (=celostátní) **vyhledávání chorob v jejich časném, preklinickém stadiu tak**, aby se tyto choroby diagnostikovaly a léčily dříve, než se stačí projevit a způsobit dítěti nevratné poškození zdraví. Pod pojem novorozenecký screening lze v širším slova smyslu zahrnout i pravidelné klinické vyšetření dětským lékařem při pátrání po vrozených vývojových vadách různých orgánů či vrozených infekcích, vyšetření ortopedem při vyhledávání vrozené poruchy vývoje kyčlí (dysplazie), vyšetření očním lékařem při vyhledávání vrozeného očního zákalu (katarakty), vyšetření sluchu při vyhledávání vrozené hluchoty či ultrazvukové vyšetření ledvin k časnému záchytu vrozených vývojových vad močového ústrojí.

# VÝVOJ NOVOROZENECKÉHO SCREENINGU

- 1962 -zakladatel - prof. Robert Guthrie** – zavedl bakteriální test pro včasné rozpoznání ***PKU a hyperfenylalaninemie*** v USA (využití kmene bakterií *Bacillus subtilis*, množí se v prostředí v vysokou koncentrací fenylalaninu)
- **od r. 1969 Guthrieho metoda i u nás, celoplošný screening až od r. 1975**
- od r. 1985 - rozšíření screeningu o vyšetření ***kongenitální hypotyreózy (CH)*** –*jodový deficit plodu, těžké pošk.vývoje mozku dítěte*
- od r. 2006 - přibývá vyšetření ***kongenitální adrenální hyperplazie (CAH)*** – dříve tzv. adrenogenitální syndrom
- **2009** – změny a rozšíření screeningu (dle Věstníku MZ ČR)
  - screening rozšířen o ***screening cystické fibrózy***

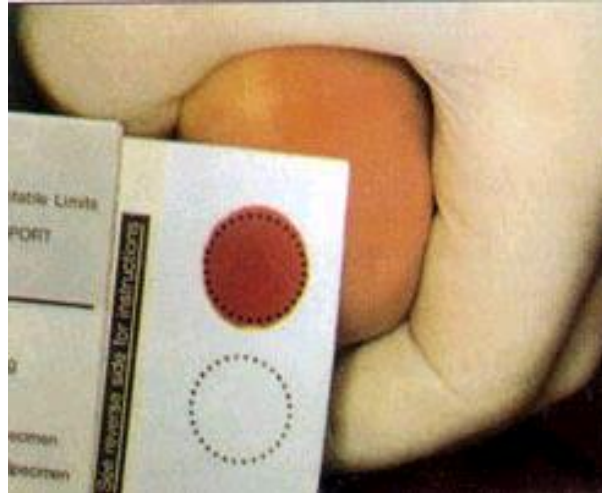


- V užším slova smyslu se novorozeneckým screeningem rozumí tzv. novorozenecký laboratorní screening (NLS), který je předmětem těchto webových stránek. Spočívá v diagnostice screenovaných **onemocnění** na základě stanovení koncentrace specifické látky (event. i průkazu genové mutace) v **suché kapce krve** na filtračním papírku – tzv. novorozenecké screeningové kartičce, která je odebírána všem novorozencům na území státu.
- **Pravděpodobnost, že právě jeden konkrétní vyšetřovaný novorozenec bude trpět některým z výše uvedených onemocnění, je velmi malá. Stane se tak pouze u jednoho dítěte z přibližně 1150 narozených. Právě jemu ale novorozenecký screening pomůže uchránit zdraví, někdy i život, a z hlediska ekonomie zdravotnictví sníží náklady na jeho léčbu, protože náklady na léčbu komplikací vzniklých z pozdě diagnostikované choroby bývají mnohem vyšší.**
- <http://www.novorozeneckyscreening.cz/historie-ns-cr>

Metabolická příručka, Laboratorní příručka Diagnostických laboratoří  
Ústavu dědičných metabolických poruch

VFN a 1. LF UK - [udmp.lf1.cuni.cz/file/5673/Metabolická%20příručka%20verze%2002.pdf](http://udmp.lf1.cuni.cz/file/5673/Metabolická%20příručka%20verze%2002.pdf)

## Definice:



**Novorozenecký screening (NS) = aktivní celoplošné vyhledávání choroby v jejím preklinickém stadiu.**

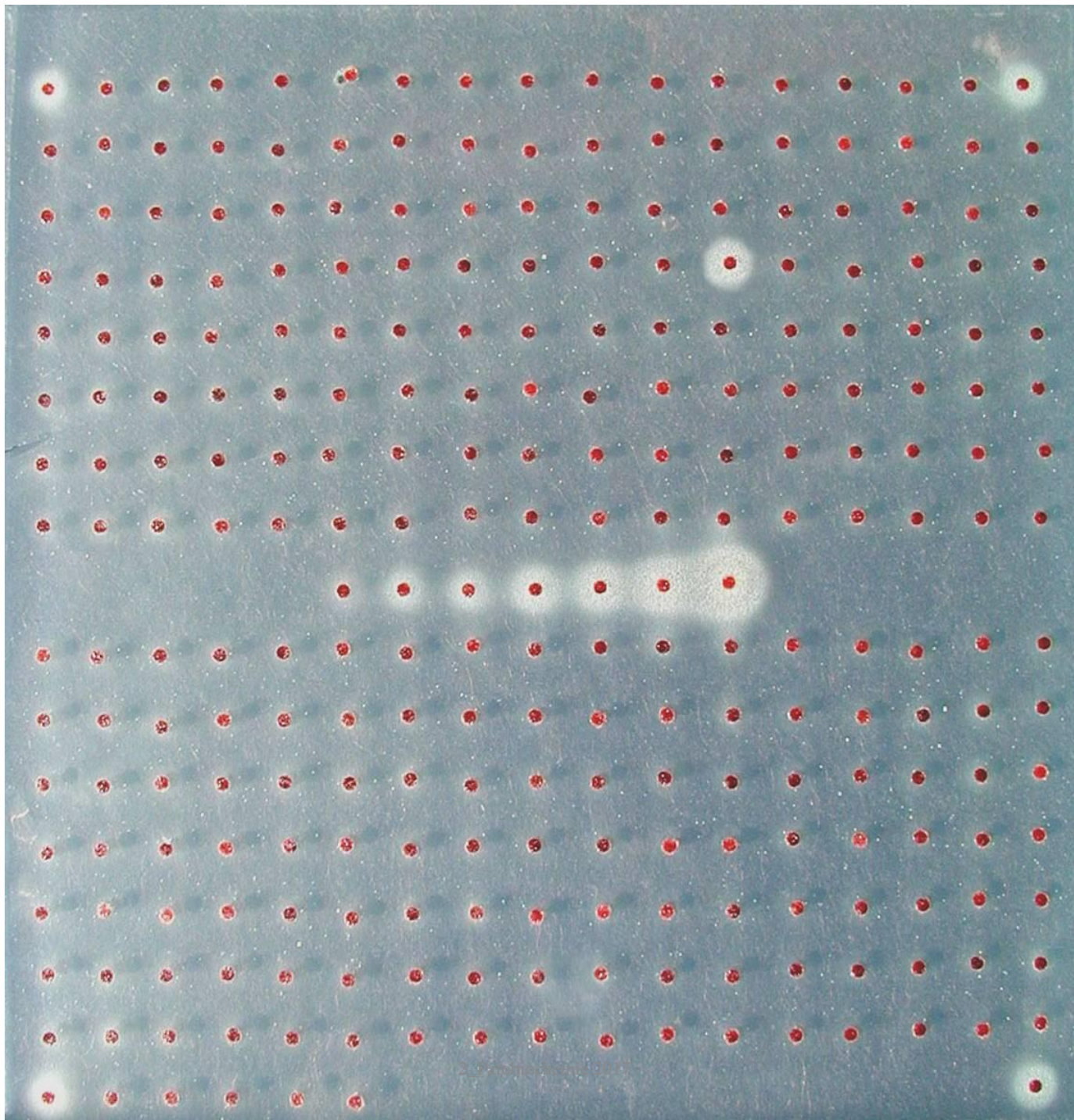
**Analýza suché kapky krve na filtračním papírku odebrané standardním způsobem z patičky všem novorozencům.**

# Hyperfenylalaninémie/ fenylketonurie

- **Charakteristika:** nedostatečná přeměna Phe na Tyr
- **Příčina:**
  - 1) Deficit fenylalaninhydroxylázy
  - 2) Porucha metabolismu koenzymu tetrahydrobiopterinu
- **Výskyt:** asi 1:10 000, patří mezi nejčastější DPM
- Existuje novorozenecký screening- u nás od r. 1975 celoplošně – Guthrieho test
- Tandemová hmotnostní spektrometrie

# Odběr krve na novorozenecký screening





2.0 Protonen 2017

# Předpoklady pro provádění celoplošného screeningu jsou shrnuty v následujících bodech:

- **Vyšetřovaná choroba musí být jasně definována, tj. diagnostikovatelná.**
- **Choroba představuje významný zdravotně sociální problém.**
- **Choroba je častá**, má v dané populaci určitou incidenci. Hranice incidence je však relativní a je ovlivněna především faktory ekonomickými. Ve vyspělých zemích lze v současné době spatřovat tuto hranici v incidenci 1:50 000 – 1:100 000.
- **Zachycení choroby v jejím časném, presymptomatickém stadiu umožňuje taková léčebná opatření, která zásadním způsobem pozitivně ovlivní průběh choroby či dokonce sníží úmrtnost na ni. Léčebná opatření musí být běžně dostupná a zajiřitelná pro všechny zachycené jedince.** Péče o pacienty je většinou soustředována do specializovaných center s cílem dosažení maximální efektivity a kvality léčby.
- **Existuje obecně uznaný screeningový test**, tj. choroba je v preklinickém stadiu detekovatelná obecně uznaným laboratorním testem v suché kapce krve s obecně přijatou hranicí negativity (tzv. "cut-off" limit) a obecně akceptovatelnou zátěží zdravé populace (frekvence opakování odběru NS pro nejasný výsledek - tzv. "recall-rate" a falešná pozitivita, vyjádřená pozitivně prediktivní hodnotou - PPV). *Pozn.: Parametry hodnoty "cut-off" limitu, „recall-rate“, falešné positivity a falešné negativity jsou hlavními měřítky věrohodnosti screeningu.*
- **Společnost je schopna zajistit provádění laboratorního testu u všech svých novorozenců po stránce organizační a ekonomické.**
- **Efektivita a účinnost NS je předmětem průběžného vyhodnocování.**
- Díky vědeckému a technologickému pokroku se počet onemocnění, která je možno diagnostikovat z nepatrného množství krve v suché kapce krve na filtračním papírku, navýšil na několik desítek.

# V České republice se od 1. 6. 2016 vyšetřuje 18 onemocnění:

1. vrozená snížená funkce štítné žlázy (**kongenitální hypotyreóza - CH**)
2. vrozená nedostatečnost tvorby hormonů v nadledvinách (**kongenitální adrenální hyperplazie - CAH**)
3. vrozená porucha tvorby hlenu (**cystická fibróza - CF**)
4. dědičné poruchy látkové výměny aminokyselin\*
  1. vrozená porucha látkové výměny aminokyseliny fenylalaninu (fenylketonurie - PKU a hyperfenylalaninemie - HPA)
  2. **argininémie (ARG)**
  3. **citrulinémie I. typu (CIT)**
  4. vrozená porucha látkové výměny větvených aminokyselin (leucinóza, nemoc javorového sirupu - MSUD)
  5. **homocystinurie z deficitu cystathionin beta-syntázy (CBS)**, pyridoxin non-responzivní forma
  6. **homocystinurie z deficitu methylenetetrahydrofolátreduktázy (MTHFR)**
  7. glutarová acidurie typ I (GA I)
  8. izovalerová acidurie (IVA)
5. dědičné poruchy látkové výměny mastných kyselin\*
  1. deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (deficit MCAD)
  2. deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s dlouhým řetězcem (deficit LCHAD)
  3. deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (deficit VLCAD)
  4. deficit karnitinpalmitoyltransferázy I (deficit CPT I)
  5. deficit karnitinpalmitoyltransferázy II (deficit CPT II)
  6. deficit karnitinacylkarnitintranslokázy (deficit CACT)
6. dědičná porucha přeměny vitamínů\*
  1. **deficit biotinidázy (BTD)**

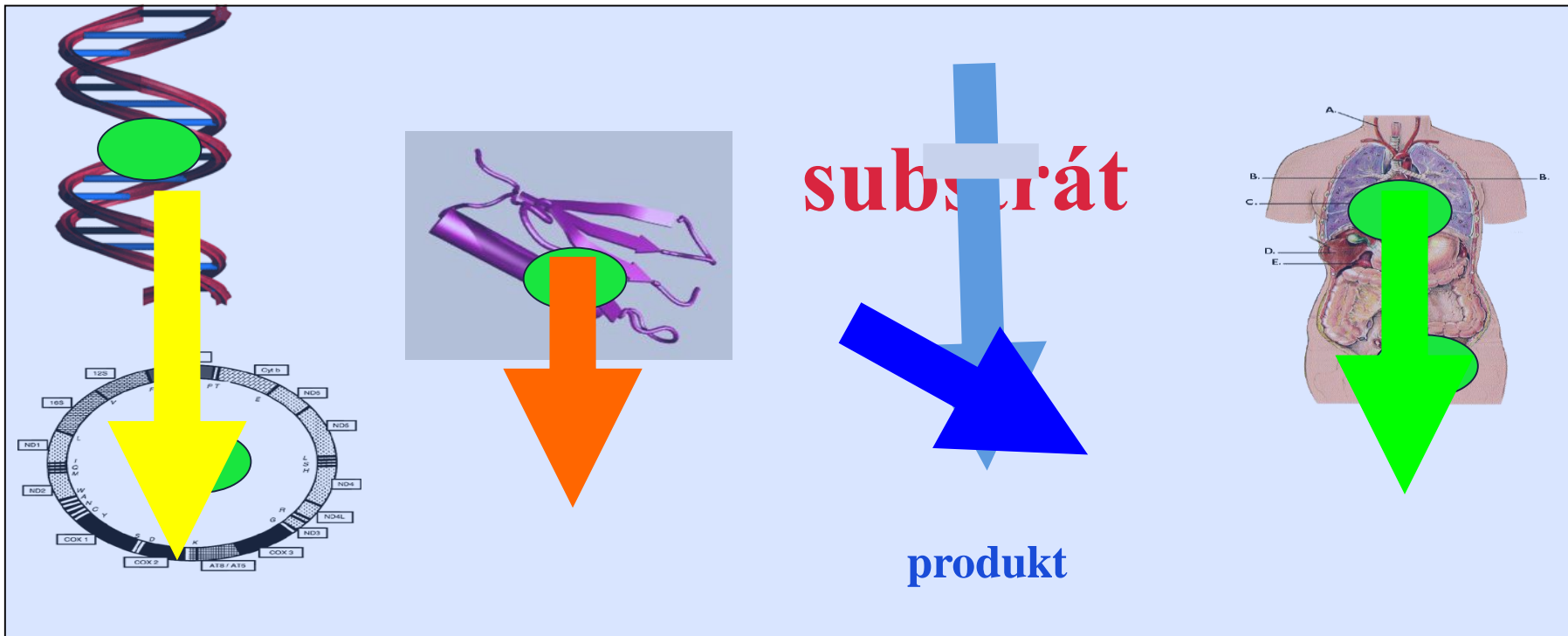
\*Metodika tandemové hmotnostní spektrometrie použitá pro vyšetřování dědičných metabolických poruch může zachytit dalších přibližně 20 onemocnění.

# Analýza DNA - poznámka

- Laboratoř provádí molekulárně genetickou diagnostiku vybraných DMP a jiných genetických chorob. V současné době pracoviště může analyzovat více než 60 genů pro potřeby postnatální i prenatální diagnostiky (Tabulka 23 – metodická příručka). Základními technikami je sekvenování Sangerovou metodou,
- fragmentační analýza a MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification).
- Při vyšetření genomové DNA je metodou sekvenování analyzována celá kódující sekvence genu
- spolu s přiléhajícími intronovými oblastmi. Pokud byly v rodině mutace již identifikovány, u
- příbuzných se obvykle vyšetřují pouze tyto mutace.

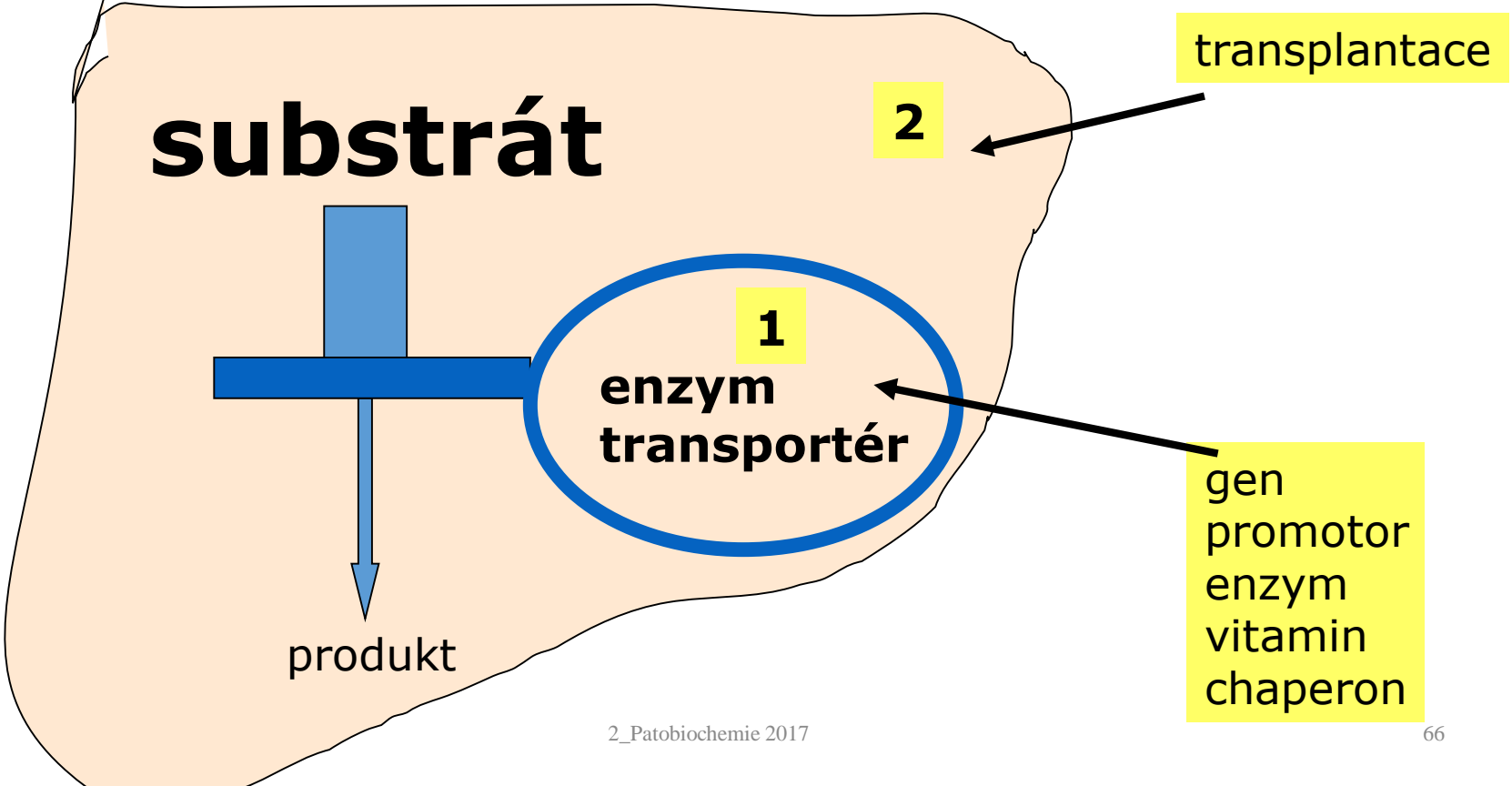


# Léčba DMP

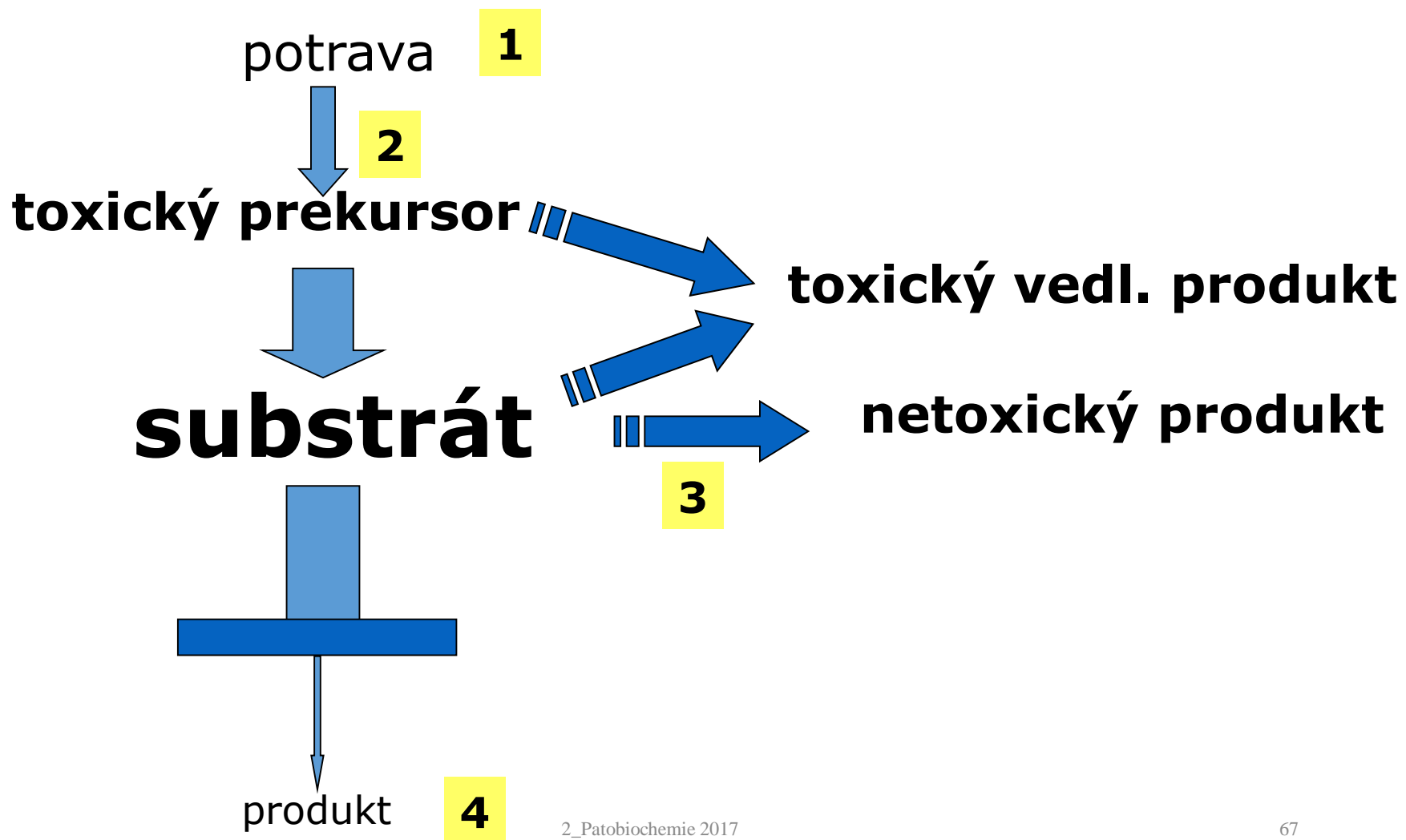


# Léčba 1- kauzální

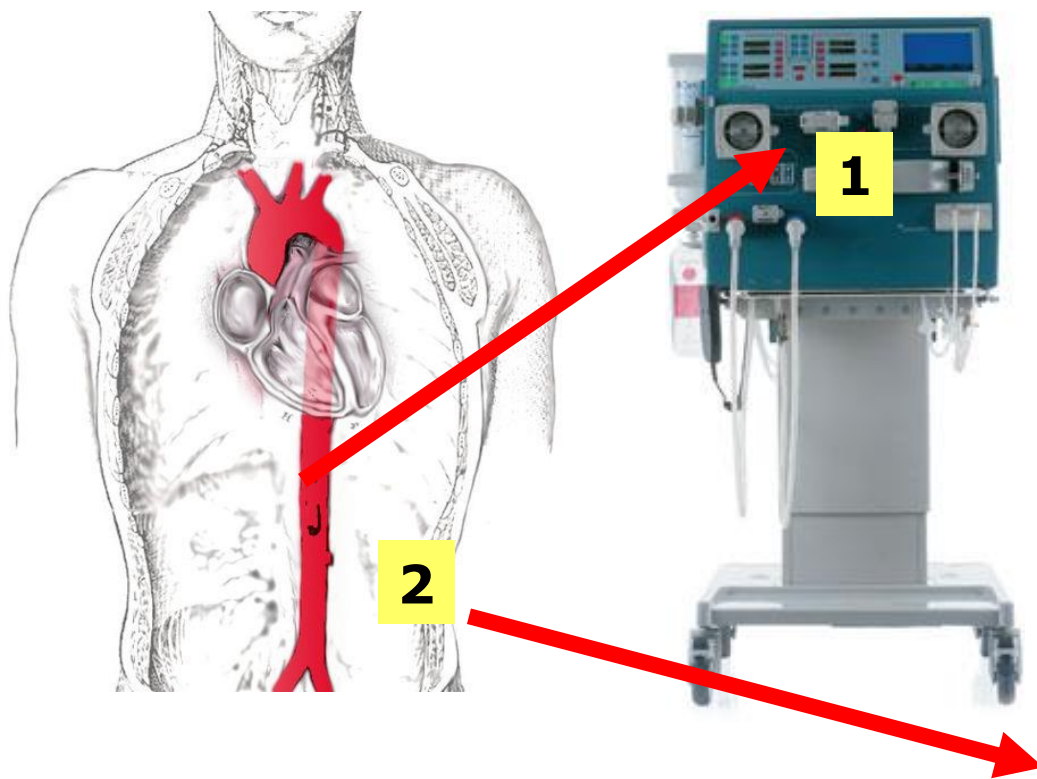
Pro pacienty s **cystickou fibrózou (CF)**, kteří mají **mutaci třídy III G551D**, je od roku 2012 k dispozici **kauzální léčba**. Mechanismus účinku léku **ivacaftor** spočívá v opravě funkce **chloridového kanálu CFTR**, poškozeného touto mutací. Potvrzená účinnost nového léčebného postupu, reprezentovaného právě lékem **ivacaftor**, přináší reálnou naději, že bude časem možné řešit základní příčinu onemocnění i u pacientů s dalšími typy mutací v genu **CFTR**.



# Léčba 2- ovlivnění dráhy



# Léčba 3- systémová



**Eliminace toxinů**  
Hemodialýza  
Hemadsorption  
Výměnná transfúze

**Obecná léčba**  
Energie  
Hydratace  
Léčba infekce  
Atd.

# Léčba DPM

- 1. Na úrovni metabolitu**
  - 2. Na úrovni enzymu**
  - 3. Na buněčné úrovni**
- Jediná kauzální léčba – na buněčné úrovni.
  - Léčba symptomatická a podpůrná – zmírňuje projevy, neodstraňuje příčinu.

# 1. Léčba na úrovni metabolitu

- a) Omezení příjmu či vzniku toxických metabolitů (např. dieta u PKU, galaktosémie, prevence katabolismu u aminoacidopatií, org.acidurií)
- b) Odstranění toxických metabolitů ( peritoneální dialýza, hemodialýza, výměnná transfúze) a využití alternativních metabolických drah (např. **podávání benzoátu u hyperamonémií**)
- c) Podávání metabolických inhibitorů ( např. allopurinol při hyperurikémii )
- d) Náhrada deficitních produktů ( např. argininu u poruch močovinového cyklu, tyrosinu u PKU)

## 2. Léčba na úrovni enzymu

- a) **Aktivace enzymu** dodávkou koenzymů ve farmakologických dávkách ( např. pyridoxinu u deficitu cystathionin  $\beta$ -synázy)
- b) Dodávka deficitního enzymu** přímo – **enzymoterapie** ( např. u Gaucherovy či Fabryho choroby, některých typů mukopolysachyridóz či glykogenóz)

### 3. Léčba na buněčné úrovni

- **Genová terapie** s virovými či nevirovými vektory
- Zvláštní postavení v léčbě pak zaujímá **transplantace orgánů a tkání** ( např. jater u tyrosinémie, ledvin u cystinózy, kostní dřeně u adrenaleukodystrofie)



# Choroby potenciálně léčitelné genovou terapií

## Chybějící sérové proteiny

Hemofilie-faktor VIII, IX

Wilsonova choroba- Ceruloplasmin

## Metabolické choroby

Deficience omitin dekarboxylázy

## Svalové dystrofie

## Poruchy imunitního systému

SCID-ADA deficience, X=linked...

## Další choroby s Mendelovskou dědičností

Cystická fibróza

Nahrazení chybějícího  
či mutovaného genu

## Malignity

Solidní nádory

Leukemie, Lymfomy

Zabití buněk

## Neurodegenerativní choroby

Alzheimer- agregace Tau

Huntingtonova choroba

Parkinsonova choroba

Odstranění  
agregovaného proteinu

## Multifaktoriální choroby

Kardiovaskulární choroby

Oční choroby

Kompenzace poruchy,  
regulace

- Gene Therapy has made important medical advances in less than two decades. Within this short time span, it has moved from the conceptual stage to technology development and laboratory research to clinical translational trials for a variety of deadly diseases. Among the most notable advancements are the following:
- **Gene Therapy for Genetic Disorders**
- **Severe Combined Immune Deficiency (ADA-SCID)** ADA-SCID is also known as the bubble boy disease. Affected children are born without an effective immune system and will succumb to infections outside of the bubble without bone marrow transplantation from matched donors. A landmark study representing a first case of gene therapy "cure," or at least a long-term correction, for patients with deadly genetic disorder was conducted by investigators in Italy. The therapeutic gene called ADA was introduced into the bone marrow cells of such patients in the laboratory, followed by transplantation of the genetically corrected cells back to the same patients. **The immune system was reconstituted in all six treated patients without noticeable side effects, who now live normal lives with their families without the need for further treatment.**

### **Chronic Granulomatus Disorder (CGD)**

CGD is a genetic disease in the immune system that leads to the patients' inability to fight off bacterial and fungal infections that can be fatal. Using similar technologies as in the ADA-SCID trial, investigators in Germany treated two patients with this disease, whose reconstituted immune systems have since been able to provide them with full protection against microbial infections for at least two years.

- **Hemophilia**  
Patients born with Hemophilia are not able to induce blood clots and suffer from external and internal bleeding that can be life threatening. In a clinical trial conducted in the United States , the therapeutic gene was introduced into the liver of patients, who then acquired the ability to have normal blood clotting time. The therapeutic effect however, was transient because the genetically corrected liver cells were recognized as foreign and rejected by the healthy immune system in the patients. This is the same problem faced by patients after organ transplantation, and curative outcome by gene therapy might be achievable with immune-suppression or alternative gene delivery strategies currently being tested in preclinical animal models of this disease.
- **Other genetic disorders** After many years of laboratory and preclinical research in appropriate animal models of disease, a number of clinical trials will soon be launched for various genetic disorders that include congenital blindness, lysosomal storage disease and muscular dystrophy, among others.

# Gene Therapy for Acquired Diseases

- **Cancer** Multiple gene therapy strategies have been developed to treat a wide variety of cancers, including suicide gene therapy, oncolytic virotherapy, anti-angiogenesis and therapeutic gene vaccines. Two-thirds of all gene therapy trials are for cancer and many of these are entering the advanced stage, including a **Phase III trial of Ad.p53 for head and neck cancer and two different Phase III gene vaccine trials for prostate cancer and pancreas cancer**. Additionally, numerous Phase I and Phase II clinical trials for cancers in the brain, skin, liver, colon, breast and kidney among others, are being conducted in academic medical centers and biotechnology companies, using novel technologies and therapeutics developed on-site.
- **Neurodegenerative Diseases** Recent progress in gene therapy has allowed for novel treatments of neurodegenerative diseases such as Parkinson's Disease and Huntington's Disease, for which exciting treatment results have been obtained in appropriate animal models of the corresponding human diseases. Phase I clinical trials for these neurodegenerative disorders have been, or will soon be, launched.
- **Other acquired diseases**  
The same gene therapeutic techniques have been applied to treat other acquired disorders such as viral infections (e.g. influenza, HIV, hepatitis), heart disease and diabetes, among others. Some of these have entered, or will soon be entering, into early phase clinical trials.
- [www.asgct.org/about\\_gene\\_therapy/diseases.php](http://www.asgct.org/about_gene_therapy/diseases.php)
- [http://www.asgct.org/about\\_gene\\_therapy/diseases.php](http://www.asgct.org/about_gene_therapy/diseases.php)

# 2\_3\_ENZYMY

**Enzymy – proteiny - urychlují biochemické reakce**

- **1 molekula přeměněná v nekatalyzované reakci na 106 až 1014 molekul přeměněných při reakci katalyz.enzymem**

Mechanismus účinku enzymů spočívá ve **snížení aktivační energie** pro příslušnou reakci (umožňují průběh metabolických pochodů při relativně nízkých teplotách (37°C) a při pH 6,5-7,5 ve vodném prostředí)

V živočišné buňce je **1000 až 4000 různých enzymů**

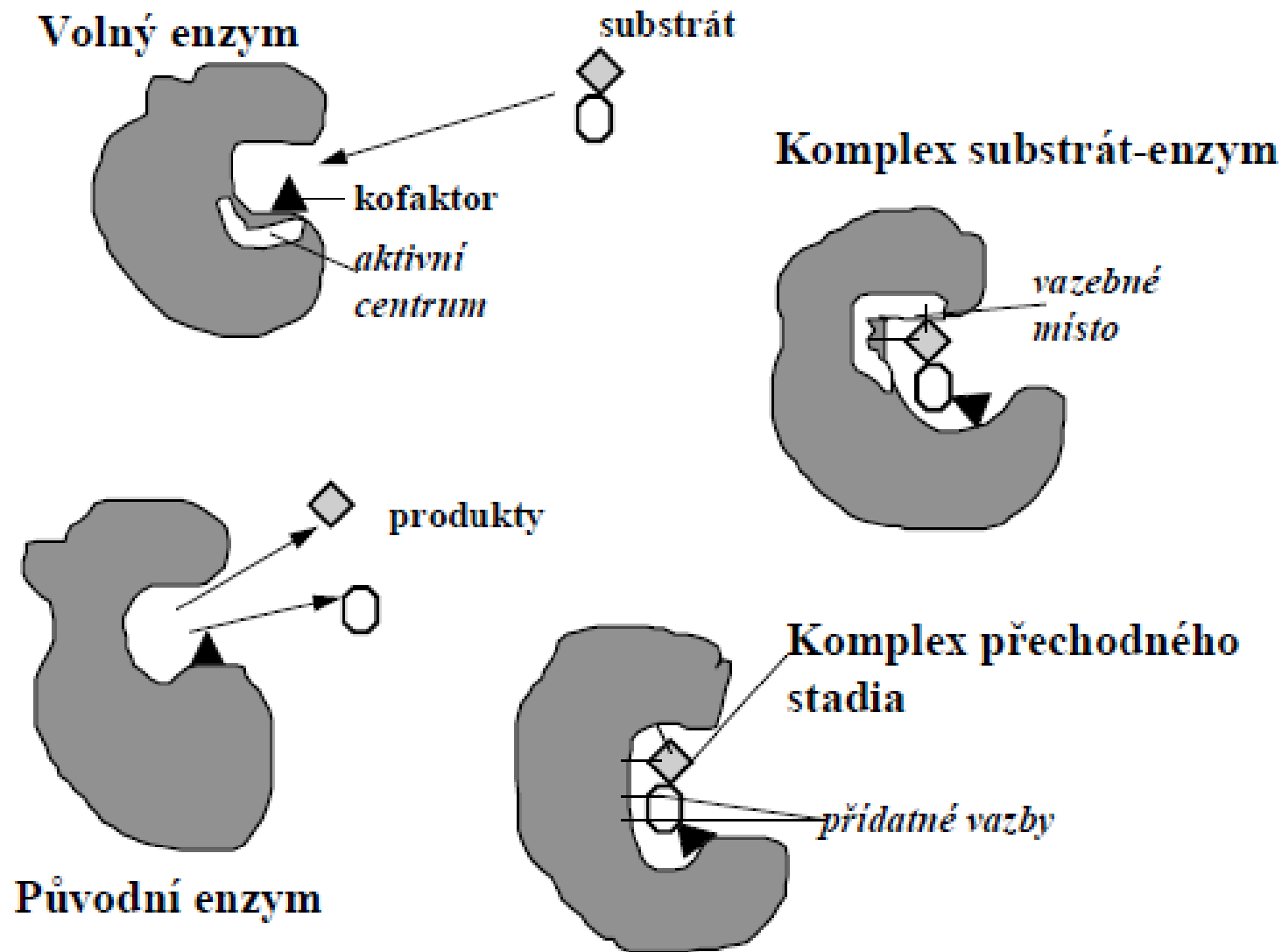
- bílkovinná část - **apoenzym**, nebílkovinná - **koenzym**
- látky vstupující do reakce - **substráty**, látky vznikající –**produkty**
- **Reakce** : **substrát se váže na specifické vazebné místo** na molekule enzymu (vazebné místo je vklíněno do prohlubně enzymu tzv. aktivní centrum)

# Enzymatická reakce-princip

## Vazba substrát - enzym :

- prostřednictvím **nekovalentní iontové vazby**
- **vodíkových a hydrofobních můstků**
- **van der Waalsových interakcí**
  
- Na **funkční skupiny aminokyselinových zbytků** akt.v.místa enzymu jsou napojeny **koenzymy, příp.atomy kovu** (metaloenzymy), účastní se katalyzované reakce
  
- Funkční skupiny **aktivují substrát a snižují energii**, která je potřebná pro vytvoření vysokoenergetického intermediárního stadia

# Vazba enzym-substrát



# Patobiochemie regulací enzymové aktivity

## Inhibice enzymové aktivity

Účinek četných léků nebo toxinů spočívá ve schopnosti **inhibovat enzym**.

**Nejsilnější inhibitory**- váží se **kovalentně** k funkčním skupinám aktivního místa, příp. ako **analogy substrátové molekuly** - tvoří s enzymem komplexy

## Rychlost enzymové reakce:

a) koncentrací **substrátu, produktu**

b) koncentrací **aktivátorů**, koncentrací **inhibitorů**

Vztah mezi rychlostí enzymové reakce a koncentrací substrátu - dán rovnicí podle Michaelise a Mentenové



**Produkty** aj. fyziologické inhibitory mohou soutěžit se substrátem o vazbu v aktivním centru enzymu a tak zpomalovat rychlost reakce

**Fyziologická regulace metabolických drah** – schopnost měnit rychlost průběhu metabolických reakcí v dané metabolické dráze pomocí aktivace enzymů, které katalyzují její nejpomalejší článek

**Enzymy** mají tzv. allosterické aktivátory nebo inhibitory tj sloučeniny, které se váží na jiné místo v molekule enzymu než je aktivní centrum a ovlivňují tak **konformaci** molekuly enzymu

Regulace také - fosforylací nebo modulátorovými proteiny

Isoenzymy: enzymy, které mají odlišný sled aminokyselin v peptidovém řetězci, ale **katalyzují stejnou reakci**



## Reverzibilní inhibice aktivního centra

- Enzymový inhibitor je sloučenina, která snižuje rychlost reakce **vazbou na enzym**. Reverzibilní inhibitory- vazba není kovalentní, mohou se od enzymu odpoutat. Produkty - jsou reverzibilními inhibitory své vlastní reakce.

## Kompetitivní inhibice

- Reverzibilní inhibitor může soutěžit o vazbu v aktivním centru se substrátem a vytvářet s enzymem komplex, ten může disociovat na volný enzym a inhibitor

## Nekompetitivní inhibice

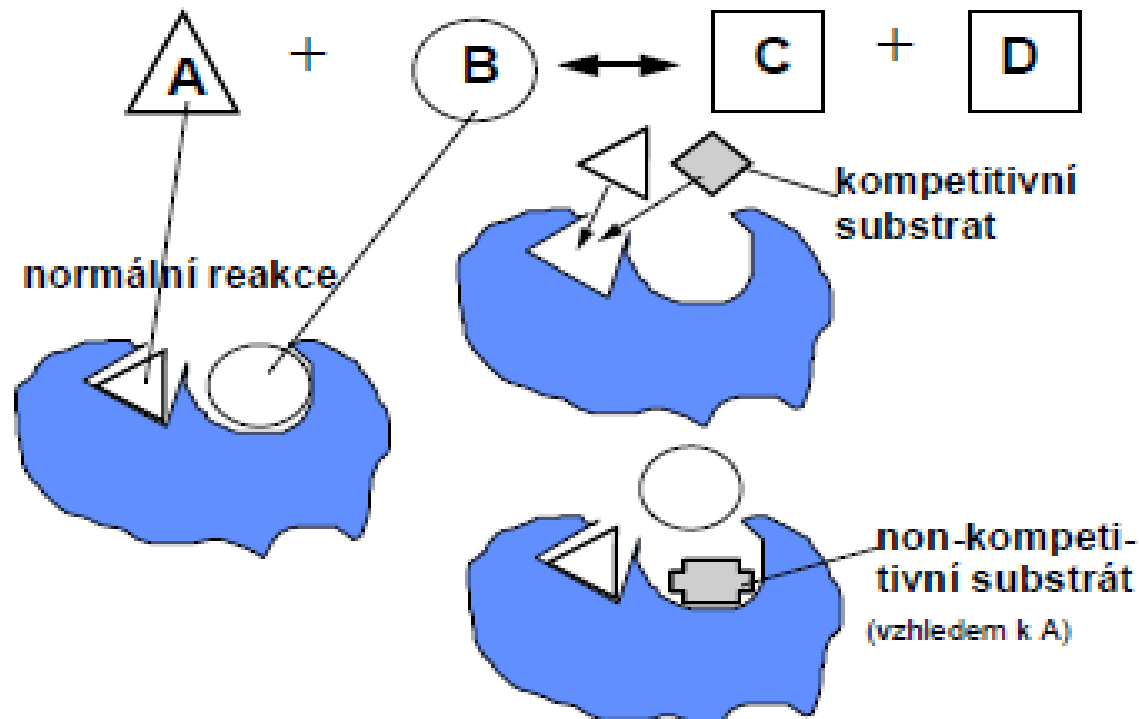
- Tento inhibitor nesoutěží o vazebné místo, ale jeho vazba na enzym snižuje koncentraci aktivního enzymu, tj. snižuje vždy  $V_{max}$

# Schéma inhibice

Při **kompetitivní inhibici** o vazebné místo pro substrát A soutěží strukturálně velmi podobný jiný substrát.

Při nekompetitivní inhibici substrát A se dostane na své vazebné místo, ale pozici na vazebném místě jeho partnera tj. substrátu B zaujímá non-kompetitivní inhibitor (vzhledem k substrátu A), který je ale kompetitivní vzhledem k B.

U **nekompetitivní inhibice** se inhibitor váže na komplex substrát-enzym.



## Nekompetitivní inhibice

- **nekompetitivní inhibitor** se váže pouze na komplex enzym–substrát (když enzym váže substráty regulovaně):
- první molekula substrátu navodí změny v konformaci molekuly enzymu, otevře se vazebné místo buď pro kosubstrát nebo pro inhibitor. Nekompetitivní inhibitor snižuje jak  $K_m$ , tak  $V_{max}$ .

## Irreverzibilní kompetitivní inhibice

- **molekuly inhibitoru** - strukturálně podobné substrátu se **vážou kovalentně** nebo tak **pevně v aktivním centru**, že z této vazby nemohou být vytěsněny. Tento způsob-častým mechanismem účinku léků nebo antimetabolitů

# Příklady irreverzibilní kompetitivní inhibice

Inhibitor	Enzym	Účinek, použití
aspirin	cyklooxygenasa	protizánětlivý efekt
allopurinol	xanthinoxidasa	léčení dny
5-fluorouracil	thymidylátsynthasa	kancerostatikum
penicilin	transpeptidasa	antibiotikum
sarin	cholinesterasa	bojový plyn
$\beta$ -aminopropionitril	lysoxidasa	abnormální sesíťování kolagenu (lathyrismus)

# Mechanismus účinku irreverzibilních inhibitorů

- **změna afinity vazebného místa** - substrátový analog má velmi reaktivní skupinu, která není v přirozeném substrátu a která **trvale blokuje aktivní centrum pro substrát** (kovalentní vazba s aminokyselinovým zbytkem)

# Příklad resistance

Indukcí  $\beta$ -laktamasy jsou takto pozměněna tzv.  $\beta$ -laktamová antibiotika :

➤ **peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy**

Obdobný účinek může mít indukce:

➤ **acetyltransferasy, fosfotransferasy nebo nukleotidyltransferasy na aminoglykosidy**

➤ **acetyltransferasa na chloramfenikol**

# Další mechanismy regulace enzymové aktivity

## Alosterické regulace

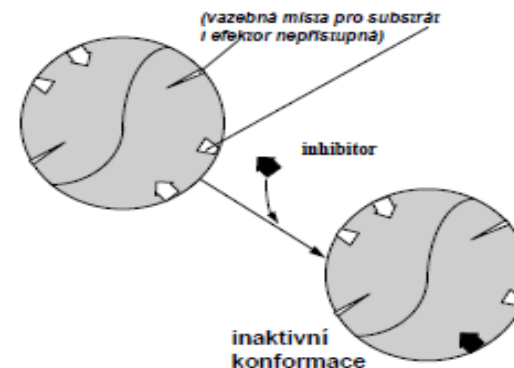
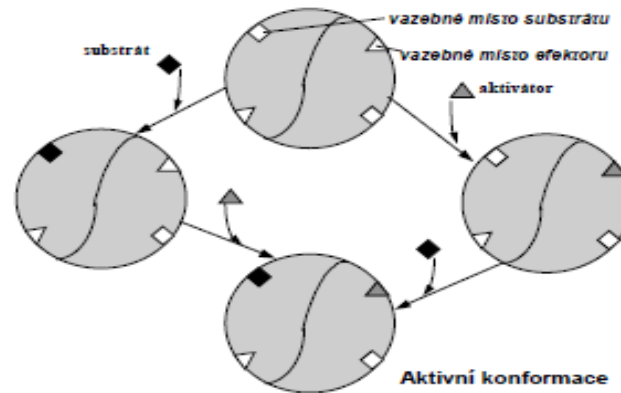
Alosterický efektor se reversibilně váže na jiné místo, než je aktivní místo enzymu.

Tato vazba navodí : konformační změnu aktivního místa,

a to tak, že buď dojde

k aktivaci enzymu

nebo jeho inhibici



## Schéma alosterické aktivace a inhibice

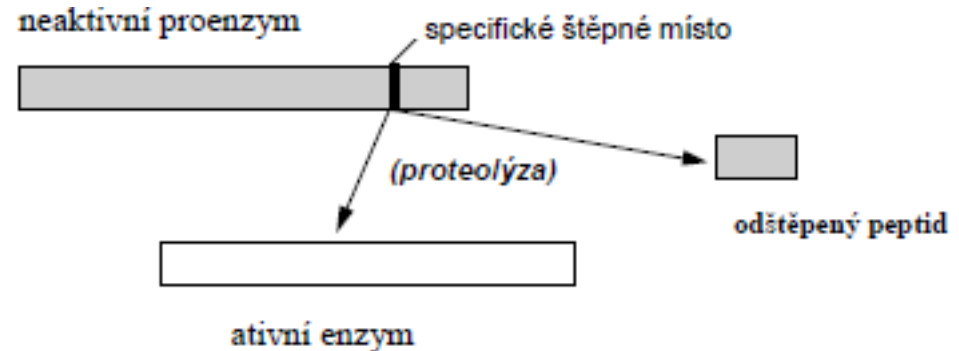
## Další mechanismy regulace enzymové aktivity

**Kovalentní modifikace** - fosforylací hydroxylové skupiny fosforylasakinasou. Fosforylace enzymu **aktivuje aktivní místo** enzymu → aktivní konformace, defosforylace → inaktivace.

**Limitovaná proteolýza** - aktivace je navozena **odštěpením krátkého peptidu** z polypeptidového řetězce, tzv. proenzymu nebo enzymogenu

✓ vede ke změně konformace aktivního místa, které může v této formě navázat substrát

**Příklad: chymotrypsinogen → chymotrypsin**  
**prothrombin → thrombin**



**Poznámka:** - proteolytické pankre slinivce jako prekurzory, se aktivují v lumen střeva. Jinak by natrávily vlastní tkáň pankreatu.



## ➤ Indukce syntézy enzymu

**množství enzymu** v buňce závisí na rychlosti jeho syntézy nebo degradace (trvá několik hodin až dní, předcházející způsoby regulací aktivity jsou minutové záležitosti)

## ➤ Potlačení syntézy enzymu

**Příklad:** tímto mechanismem -potlačením syntézy - působí např. omeprazol – potlačuje syntézu proteinu tzv. protonové pumpy v žaludeční sliznici, brání tak produkci HCl. Používá se proto pro snížení acidity žaludečního sekretu a tím omezení jeho agresivního účinku (léčba vředové choroby)

## ➤ Zpětnovazebná regulace

**konečný produkt** reguluje rychlost své vlastní syntézy, konečný produkt může metabolickou dráhu inhibovat nebo příbuzný metabolit může aktivovat regulační (klíčový) enzym

**Konečný produkt** může regulovat svoji vlastní syntézu - působením na gen pro transkripci klíčového enzymu metabolické dráhy - mnohem pomalejší proces než regulace allosterickým mechanismem.

# Klasifikace a názvosloví enzymů

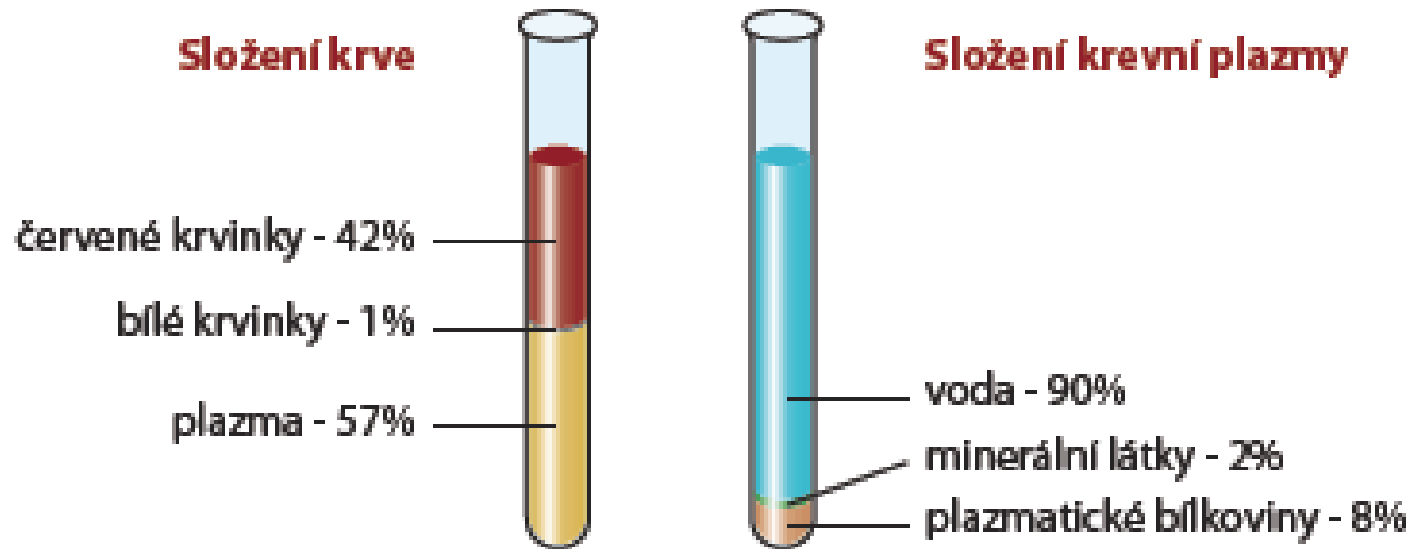
## Třídy enzymů:

1. oxidoreduktasy
2. transferasy
3. hydrolasy
4. lyasy
5. isomerasy
6. ligasy

Koncovka názvu enzymů: substrát + -asa

Př. laktátdehydrogenasa, amylasa,  
alkoholdehydrogenasa, aspartáttransaminasa...

# 2\_3 Enzymy v diagnostice

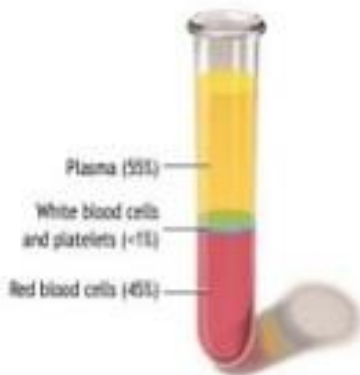


Plazma tvoří 55% naší krve a sestává se 91% z vody. Obsahuje více než 120 různých proteinů, které přebírají životně důležité funkce, jakými jsou např. obranyschopnost organismu před infekcemi a srážlivost krve při poraněních.

## 2. Plasma vs. serum

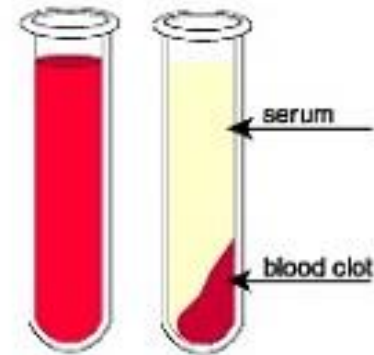
• **Plasma** is the liquid, cell-free part of blood, that has been **treated with anti-coagulants**.

Anticoagulated



**Serum** is the liquid part of blood **AFTER coagulation**, therefore devoid of clotting factors as fibrinogen.

Clotted



• serum = plasma - fibrinogen

# ENZYMY V KLINICKÉ DIAGNOSTICE

## Druhy enzymů v plasmě:

- normálně fyziologicky přítomny v plasmě pouze **enzymy kaskády krevního srážení nebo cholinesterasa (fyziologická funkce)**
- přítomny v plasmě (jsou uvolňované z buněk), ale **nemají zde funkci**, v plasmě v nízké, nepatrné koncentraci

## Buněčné a sekreční enzymy:

- **Buněčné enzymy -enzymy metabolických dějů**, lok. v cytoplasmě nebo organelách – mitochondriích, při poškození buněk se uvolňují do krevního oběhu, většina **enzymů v klinicko-biochemické diagnostice (AST, ALT, CK, LD, GMT)**
- **Sekreční enzymy** – jsou sekretovány buňkami žláz (slinné žlázy, pankreas) do extracelulárního prostoru, **NE** do plasmy! (typicky –trávicí enzymy), při onemocnění orgánu se tyto enzymy dostávají do krevního oběhu... (amyláza, pankreatická lipáza)

**V krvi zdr. člověka – koncentrace obou typů enzymů velmi nízká**

**X v buňce asi  $10^3 - 10^4$ x vyšší**

- malé množství enzymů v plasmě je důsledkem přirozené obměny buněk.

# Příčiny zvýšené aktivity, koncentrace enzymů v plasmě

1. Patologické ↑ konc. enzymů v plasmě – důsledek zvýšené permeability buněčné stěny - poškozena chemickými látkami, anoxií, hypoxií, viry, zánětem. Může vést k degradaci buňky. Při odumírání, **zániku buňky** → zvyš.aktivity fosfolipas, ty odbourávají fosfolipidy cytopl.membrány → perforace → uvolnění obsahu + enzymy do extracelulárního prostoru → plasmy
2. Příčinou zvýšené hladiny E, **zvýšená syntéza E** – není patol., ale souvisí se stavem v org :  
Př. růst kostí ↑ aktivitu osteoblastů ↑ v krvi **alkalická fosfatasa**  
**U dětí ALP 3x-7x vyšší než dospělých**

**Léky, alkohol ↑ aktivitu enzymů (jaterních) – ALP, GMT apod.**

# Příčiny zvýšené koncentrace enzymů v plasmě

## 3. Uvolňování z buněk nesouvisející s smrtí buňky nebo zvýš. syntézou –

Př. **ethanol** uvolňuje expresi mitochondriální AST v hepatocytech, její přesun na povrch hepatocytů → uvolnění do krve.

Př. **Příjem potravy** → uvolnění střevní ALP → do lymfy, ↑ v krvi .

Př. **Jaterní enzymy jsou vázány na povrch hepatocytů, mohou být uvolňovány do krve....**

## 4. Některé případy zvýš.hodnot – nedostatečné odstraňování z cirkulace.

Př. malé enzymy – amylasa, lipasa – odstraňovány z cirkulace glomerulární filtrací.

Porucha fce ledvin, renální selhání ↑ jejich hodnoty v krvi.

Tvorba komplexů E-Ab (tzv. makroenzym), počas rozpadu Ig-3týdny

# Časový průběh nárůstu a poklesu enzymové aktivity v plasmě

Časový průběh – ovlivněn řadou faktorů:

➤ **Při apoptose se defekty buněč. membrány prohlubují s časem.** Důsledek- z buňky se uvolňují nejdříve malé molekuly E, později velké E.

Př. při infarktu myokardu(IM) – **nejdříve v plasmě AST a CK** (malé molekuly), **později LD** (větší). Při IM – koncentrace CK v plasmě je úměrná velikosti ložiska zasaženého IM.

➤ **Když příčina poškození buněk vymizí, koncentrace enzymu přetrvává nějakou dobu, poté klesá.**

Př. **akutní hepatitida** se dá odlišit od **toxického** poškození jater. Při vir. hepatitidě – imunologické poškození buněk, delší setrvávání zvyš. koncentrace enzymu, tox. poškození – rychlejší návrat hladiny enzymu k normálu (GGT,AST, ALT).



# Aktivita enzymů v plasmě

- **Gradient koncentrace enzymů mezi buňkou a plasmou –** uvnitř hepatocytu v cytoplasmě = **vyšší koncentrace AST** než ALT , LD zde minimálně.
- Př. při poškození hepatocytu - nejrychlejší nárůst AST, ale LD minimálně.
- Př. myokard – vysoká konc.CK, nízká LD, poškození→ rychlý vzestup CK v plasmě

**Koncentraci enzymu v plasmě určuje rychlost jeho odstraňování.**

- **nízkomolekulární –glomerul. filtrace**
- **ostatní (většina) - inaktivovány v plasmě, odstraněny buňkami RES přes receptory, endocytóza**

# Definice - biologický poločas enzymu

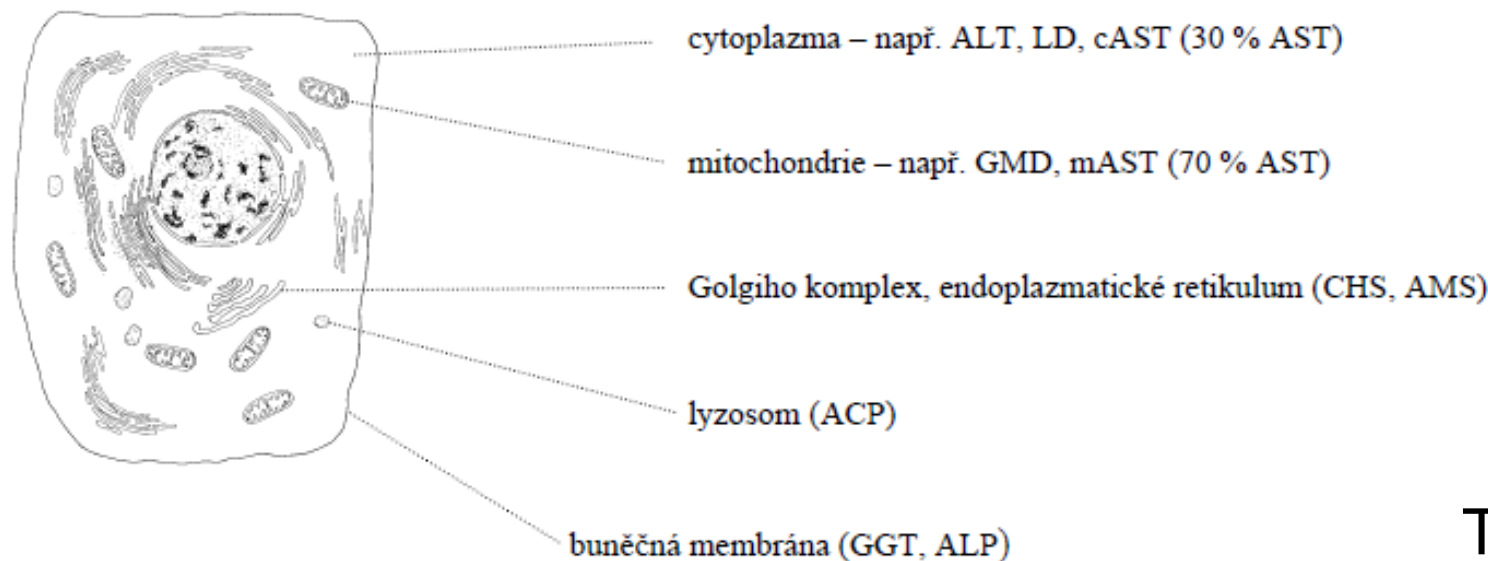
Dobu, po kterou je enzym v plasmě zvýšen určuje jeho biologický poločas.

Biologický poločas enzymu – doba, za kterou by množství enzymu kleslo na polovinu, pokud by nebyl enzym ze tkání doplněn

<u>Enzymy</u>	<u>Biol.poločas</u>
ALP	3-7 dny
AMS	9-18 hod
ALT	2 dny
AST	12-14 hod
CHS	10 dní
CK	10 hod
GMT	3-4 dny
LDH1(HHHH)	4-5 dní
LDH5(MMMM)	10 hod

# Subcelulární lokalizace některých enzymů v jaterní buňce

Hlavní diagnostické enzymy jaterní buňky jsou lokalizovány v různých oblastech hepatocytu.  
**ALT a cytoplazmatický isoenzym AST se nachází v cytoplasmě.**



## TEST

- Při membránovém poškození (např. virovém, nebo chemickou látkou) jsou tyto enzymy uvolněny a dostávají se do sinusoidů. Důsledkem je zvýšení hladiny v plazmě.
- **Mitochondriální AST** je primárně uvolněna při poškození mitochondrií, např. při působení alkoholu.
- **ALP a GGT** se nachází na kanalikulárním povrchu hepatocytů a uvolňují se zejména při cholestáze v důsledku působení žlučových kyselin na membránu.
- **GGT** se nachází rovněž v mikrosomech, kde je indukována některými léky. Podávání těchto léků pak zvyšuje hladinu GGT v plazmě.

- **Detekce poškození tkáně**
- **Identifikace počátku poškození tkáně**
- **Stanovení rozsahu poškození**
- **Odhad závažnosti poškození buněk**
- **Diagnóza základních onemocnění**
- **Specifikace diagnózy v rámci poškozeného orgánu**

# Upřesnění diagnózy

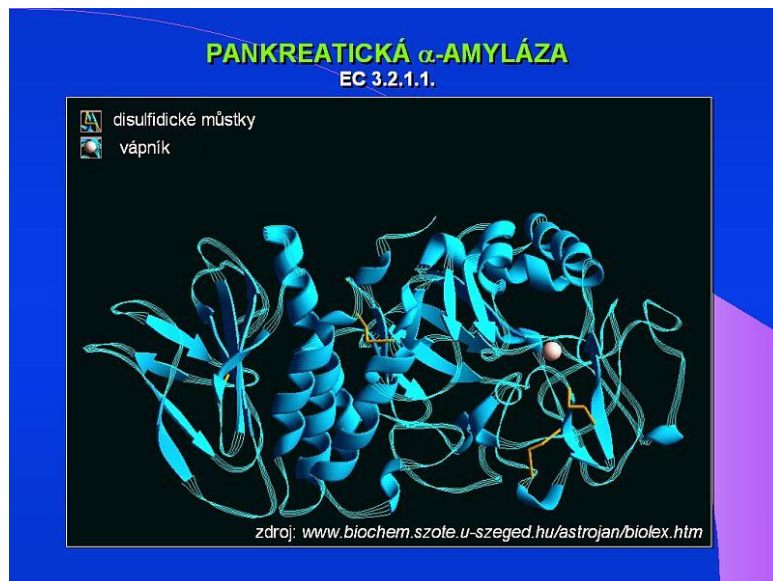
- Informace vhodná pro upřesnění diagnózy se získá:
- - z hodnoty **katalytické koncentrace enzymu v tělní tekutině** (přímá úměra mezi stupněm poškození orgánu a zvýšenou aktivitou enzymy v krvi).
- - s přítomného **spektra enzymů v krvi** (např. při **těžkém poškození jaterního parenchymu**

doprovázeném nekrózou buněk je zvýšení aktivity enzymů v krvi následné: **LD > AST > ALT**).

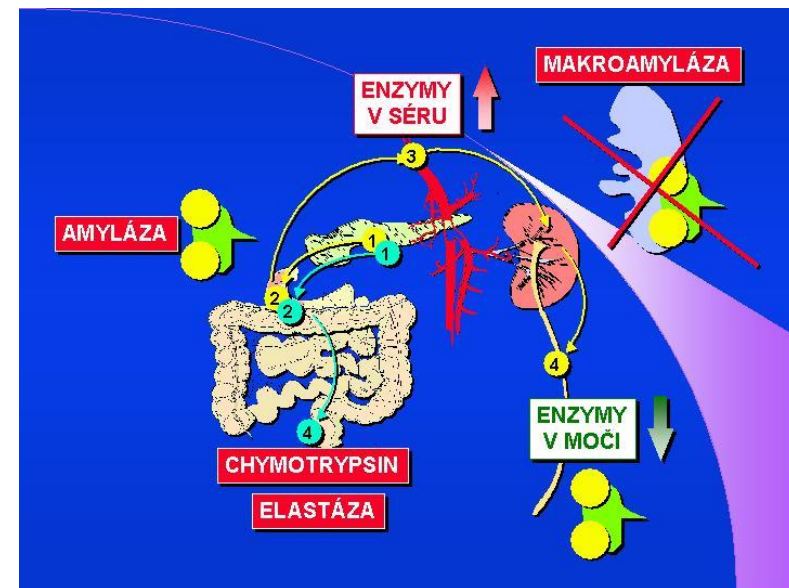
- - z výpočtu poměru aktivit enzymů (např. **dle poměru aktivit AST/ALT** v séru lze odlišit počáteční obstrukční ikterus ( $AST/ALT < 1$ ) od aktivní chronické hepatitidy ( $AST/ALT > 1$ ). U akutních onemocnění lze z poměru aktivit enzymů s krátkým a dlouhým biologickým poločasem určit fázi onemocnění nebo předpovědět průběh onemocnění, např. u akutní hepatitidy pokles poměru AST (poločas 12 h)/ALT (poločas 2 dny) napomáhá rozlišení typu hepatitidy.
- - z **monitorování enzymové aktivity** (mechanismus uvolňování enzymů do krve z poškozené tkáně a jejich clearance je charakteristický typickými kinetickými křivkami aktivity, z jejichž průběhu je možné odvodit časový úsek, během kterého je onemocnění přítomné nebo lze určit fázi onemocnění)
- - ze **stanovení isoenzymů**.

# Makroenzymy

- Makroenzymy jsou komplexy tvořené **enzymem** navázaným imunoglobulin, některý lipoprotein, protein nebo fragment buněčné membrány.
- Obecně mají makroenzymy větší molekulovou hmotnost a delší poločas v krvi. Přítomnost makroenzymu v séru může ovlivnit jeho analytické stanovení nebo způsobit chybnou interpretaci výsledku stanovení.
- Známým příkladem je **makroamylasemie**, **kdy amylasa tvoří komplex jinými makromolekulami a není tudíž filtrovatelná do moče**. V důsledku toho se akumuluje v krvi. Hladina **amylasy** je pak v krvi zvýšená, aniž by docházelo k jejímu zvýšenému uvolňování z poškozené tkáně (asi 1-3% pacientů se zvýšenou hladinou sérové amylasy).
- Protože makroamylasa neprostupuje do moče, hladina amylasy moči je v tomto případě normální nebo snižená, na rozdíl od situace při např. pankreatitidě, kdy zvýšená hladina amylasy v séru je provázána i zvýšením amylasy v moči.

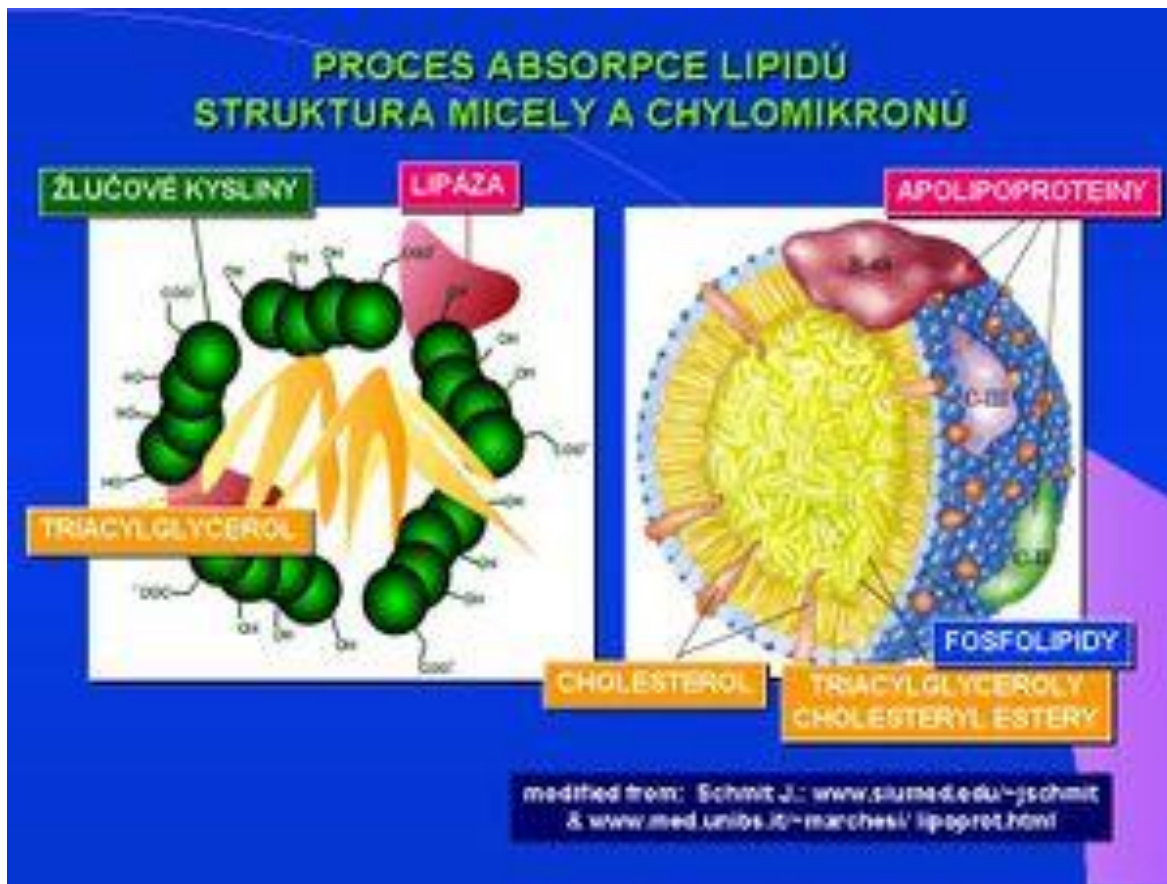


2\_Patobiochemie 2017



# Makrolipáza (makroforma enzymu)

- byla prokázána u 2 ze 20 pankreatitid se zvýšenou hodnotou lipázy a tvořila 10–18 % celkové aktivity. Poprvé byla popsána v roce 1987 u non-Hodgkin lymfomu, kdy katalytická aktivita lipázy byla zvýšena v séru 7×. Výskyt makrolipázy je v mnoha případech provázen i makroamylázou či onemocněními autoimunitního charakteru, např. céliakií.



# Tkáňová distribuce diagnosticky významných enzymů

- **Poškozená tkáň** může být diagnosticky nepřímo lokalizována buď ze stanovení aktivity tkáňově specifických enzymů, nebo isoenzymů v krvi.
- **Tkáňově specifické enzymy** se vyskytují přednostně v určité tkáni nebo mají v dané tkáni vysokou aktivitu. Příklady tkáňově specifických enzymů jsou uvedeny v následující tabulce.
- **Expresí isoenzymů** je většinou pro každou tkáň **určena geneticky**. Proto stanovení isoenzymů v krvi umožňuje identifikovat poškozenou tkáň, z které pocházejí (např. pankreatická lipasa, CK-MB, LD1).

Orgán	AST	ALT	LD	LD <sub>1</sub>	CK	GGT <sup>+</sup>	ALP	ACP	AMS	LPS	CHS
Játra	x	xx	x			xxx	x				xxx
Myokard	x	x	x	xx	xx						
Sval	x	x	x		xx						
Žlučovod							xx				
Ledviny	x		x	x		x	x				
Kosti							xx	x			
Erytrocyty*	x		x	x				xx			
Prostata								xxx			
Pankreas	x					xx			xx	xxx	
Parotis									xx		

\* v erytrocytech 100krát více LD než v plazmě

<sup>+</sup> nízká orgánová specifická, snadno indukovatelný



## Aminotransferasy

- zajišťují konverzi aminokyselin a  $\alpha$ -ketokyselin přenosem aminoskupiny, donor a akceptor aminoskupiny je 2-oxoglutarát/ L-glutamát
- Alaninaminotransferasa, ALT – donorem  $\text{NH}_2$  Ala za vzniku pyruvátu, marker- játra (virová hepatitida, alkohol, hepatopatie ...)
- Aspartátaminotransferasa, AST – donorem  $\text{NH}_2$  Asp za vzniku oxalacetátu, marker poškození - játra, srdce, infarkt myokardu, svalová poškození

**ALT** *alaninaminotransferasa* hepatopatie; srdeční onemocnění; poměr  $\text{AST} / \text{ALT} > 1$  alkoholické jaterní choroby, infarkt myokardu,  $\text{AST} / \text{ALT} < 1$  virová hepatitida

**AST** *aspartátaminotransferasa* infarkt myokardu; **hepatopatie;**  
**kevní choroby; svalová poškození**

# Klinicky významné enzymy

## $\alpha$ -amylasa, AMS

- syntetizována ve slinivce, štěpí  $\alpha$ -1,4-glykosidickou vazbu glykogenu a škrobu za vzniku oligosacharidů, produkována slin.žlázami a slinivkou břišní, liší se cukernou složkou, izoenzymy S/P, příčiny – poškození žláz (např. akutní pankreatitida), snížené vylučování enzymu ledvinami

## alkalická fosfatasa, ALP

- hydrolýza monoesterů kyseliny fosforečné s alkoholem, fenolem, glycinem – nespecifická - štěpí vazbu P-O-C, P-O-P, P-S, P-N, má několik izoform podle tkáně syntézy – kostní, jaterní, placentární, střevní, optimum v alkalické oblasti, marker - poškození kostí, jater

## kyselá fosfatasa, ACP

- vlastnosti ALP, optimum v kyselé oblasti, **marker- prostata**

# Další klinicky významné enzymy

## kreatinkinasa , CK

- katalyzuje reverzibilní fosforylaci kreatinu na kreatinfosfát za spotřeby ATP, marker poškození svalů, srdce

## Laktátdehydrogenasa, LDH

- isoformy (tkáň) srdce, játra, katalyzuje reakci: laktát + NAD<sup>+</sup> ↔ pyruvát + NADH + H<sup>+</sup> (reverzibilní), není specifická, poškození tkáně dle isoformy – elektroforeticky (plicní embolie LDH3, infarkt myokardu LDH1,2, hepatopatie + nemoci koster.svalstva LD4,5).

LD (S; konc. katal. akt. [μkat/l] abs. spektrofotometrie)

### Výpovědní hodnota

- LD se vyskytuje v cytoplasmě **všech buněk**, koncentrace ve tkáních je asi **500x vyšší** oproti koncentraci v séru. Proto i při minimálním poškození buněčné membrány dochází k elevaci LD v séru.
- Je **nespecifickým** ale **velmi citlivým markerem** poškození buněk (především hepatocytů, myocytů, kardiomyocytů, erytrocytů, leukocytů), lze ji použít jako obecný **screeningový** marker buněčné lýzy.
- Dříve používané elektroforetické vyšetření izoenzymů LD k rozlišení etiologie je v současné době nahrazeno **specifičtějšími vyšetřeními** (haptoglobin, troponiny, jaterní enzymy atd.).

# Klinicky významné enzymy

## • Příčiny zvýšené aktivity v séru

- **AST** *aspartátaminotransferasa* infarkt myokardu; **hepatopatie; krevní choroby; svalová poškození**
- **ALT** *alaninaminotransferasa* hepatopatie; srdeční onemocnění; poměr AST / ALT > 1 alkoholické jaterní choroby, infarkt myokardu, AST / ALT < 1 virová hepatitida
- **LD** *laktátdehydrogenasa* LD1,2 – infarkt myokardu, hemolytické anemie; LD3 – plicní embolie; LD4,5 – hepatopatie, nemoci kosterního svalstva
- **HBD** *hydroxybutyrátdehydrogenasa* aktivita podjednotek H (LD1,2), infarkt myokardu
- **GGT** *gama-glutamyltransferasa* hepatopatie (zánět, alkohol, léky); test chronické konzumace alkoholu; cholestáza
- **ALP** *alkalická fosfatasa* jaterní isoenzym – nemoci žlučových cest; kostní isoenzym – nemoci kostí (Pagetova choroba, rachitis, nádory), *fyziologicky zvýšen v období růstu*
- **ACP** *kyselá fosfatasa* prostatický isoenzym – tumory prostaty; kostní isoenzym – metastázy tumorů do kostí, marker osteoporózy
- **CK** *kreatinkinasa* CK-MB – **především infarkt myokardu; ale též při regeneraci kosterních svalů, chronických svalových onemocnění a akutním renálním selhání;**
- CK-MM – nemoci kosterního svalstva, intramuskulární injekce, tělesná aktivita
- **AMS** *amylasa* ( $M_r \sim 50\,000$ ) pankreatický isoenzym – akutní pankreatitida; slinný isoenzym – parotitida
- **LPS** *lipasa* akutní pankreatitida; akutní zvrát chronické pankreatitidy
- **PSA** *prostatický specifický antigen* karcinom prostaty

TEST

## • Příčiny snížené aktivity v séru

- **CHE** *cholinesterasa* **chronické hepatopatie, alkoholicko-toxická hepatitida (intoxikace organofosfáty); ukazatel jaterní proteosyntézy**