

Enzymy v diagnostice

Enzymy v plazmě

Enzymy vyskytující se v plazmě lze rozdělit do dvou typů. Jsou to jednak enzymy normálně přítomné v plazmě, které zde mají svou úlohu (např. enzymy kaskády krevního srážení nebo cholinesterasa) a dále enzymy uvolňované z buněk různých tkání, které nemají v plazmě žádnou funkci, jejichž koncentrace je za fyziologických okolností nepatrná.

Buněčné enzymy a sekreční enzymy

Buněčné enzymy jsou enzymy buněčných metabolických dějů. V buňce jsou buď rozpuštěny v cytoplazmě nebo v buněčných organelách, např. mitochondrie, anebo jsou na buněčné struktury vázány. Jako sekreční enzymy jsou označovány enzymy secernované buňkami žláz do extracelulárního prostoru, nikoliv však do plazmy (typicky trávicí enzymy). U „zdravých“ lidí nacházíme v krvi velmi nízká množství obou typů enzymů, v buňce je koncentrace řádově 10^3 – 10^4 krát vyšší. Nález malých množství těchto enzymů v plazmě je důsledkem přirozené obměny buněk.

Příčiny zvýšené aktivity buněčných enzymů v plazmě

Patologické uvolňování enzymů z buněk je nejčastěji důsledkem zvýšené permeability buněčné membrány (poškození např. chemickými látkami, anoxie, hypoxie, zánět, viry), které může vést až k degradaci buněk. Při odumírání buňky se aktivují fosfolipasy a odbourání fosfolipidů cytoplazmatické membrány vede k jejímu „proděravění“. Důsledkem je průnik makromolekul z cytoplazmy do extracelulárního prostoru a odtud do krve.

Příčinou zvýšené hladiny enzymů v krvi může být také jejich zvýšená syntéza. Např. při zvýšené aktivitě osteoblastů při růstu kostí se v krvi zvyšuje hladina alkalické fosfatasy. Proto u dětí jsou referenční hodnoty ALP v séru 3–7krát vyšší než u dospělých. Některé léky a také alkohol indukují zvýšenou syntézu jaterních enzymů GMT a ALP.

V některých případech nastává zvýšené uvolňování enzymů z buněk, aniž by bylo spojenou s buněčnou smrtí nebo zvýšenou syntézou. Např. ethanol způsobuje expresi mitochondriální AST, její přesun na povrch hepatocytů a následné uvolnění do krve. Příjem potravy indukuje uvolnění střevní alkalické fosfatasy do lymfy a následně může být dočasně zvýšena hladina enzymu i v krvi. Řada jaterních enzymů (ALP, GMT, 5'-nukleotidasa, leucinaminopeptidasa) je vázána na povrchu hepatocytů, které jsou v kontaktu se žlučovými kanálky. Zvýšená koncentrace žlučových solí při zadržení odtoku žluče může vyvolat uvolnění membránových fragmentů s navázanými enzymy do cirkulace.

V některých případech může být zvýšená hladina enzymu v plazmě vyvolána jeho nedostatečným odstraňováním z cirkulace. Např. malé enzymy, amylasa a lipasa, jsou z oběhu odstraňovány glomerulární filtrací. Renální selhání zvyšuje jejich hladinu v krvi. Proti některým enzymům se v krvi vytváří protilátky a dochází ke tvorbě komplexů enzym-protilátka (tzv. makroenzymy). Poločas těchto enzymů v krvi potom kopíruje poločas imunoglobulinu (3 týdny).

Časový průběh nárůstu a poklesu enzymové aktivity v plazmě

Časový průběh nárůstu a poklesu enzymové aktivity v plazmě ovlivňuje řada faktorů. Při buněčné smrti se defekty v buněčné membráně prohlubují s časem. Proto se z buňky nejprve uvolňují malé molekuly a teprve potom velké. Např. enzymy AST a CK jsou menší než LD a proto při infarktu myokardu se uvolňují do plazmy dříve.

Některé enzymy jsou lokalizovány v mitochondriích nebo vázány k membránám. Do krve se uvolňují až při nekroze buněk. Při infarktu, při kterém je přerušen přítok krve do určité části myokardu, musí enzymy z poškozených buněk nejprve difundovat z neperfundovaných oblastí, až poté se objeví v cirkulaci. Proto např. nárůst CK v krvi při infarktu je zpožděn pokud nejsou artérie reperfundovány účinkem trombolitik. Množství enzymu v krvi je úměrné počtu poškozených buněk. Např. u infarktu myokardu je množství CK v plazmě úměrné velikosti ložiska infarktu.

Jestliže příčina poškození buněk vymizí, zvýšená enzymová aktivita přetrvává v plazmě po určitou dobu a po té klesá. Např. při akutní hepatitidě lze na základě sledování enzymových aktivit diferencovat virovou hepatitidu od ischemického nebo toxického poškození. Při virové hepatitidě imunologické poškození buněk prodlužuje buněčné odumírání provázené elevací enzymů, zatímco při toxickém nebo ischemickém poškození dochází k rychlejšímu návratu k normálu.

Dalším důležitým faktorem je gradient koncentrace enzymu mezi buňkou a plazmou a rychlost jeho odstraňování. Např. hladiny AST v cytoplazmě hepatocytu jsou vyšší než ALT a oba enzymy mají mnohokrát vyšší koncentraci než LD. Proto při poruše jaterní buňky je v plazmě zaznamenán nejrychlejší nárůst AST, zatímco nárůst LD je velmi malý. Podobně u myokardu je gradient mezi buňkou a plazmou mnohonásobně vyšší pro CK než LD a proto počáteční nárůst prvního enzymu při infarktu myokardu je mnohem signifikantnější.

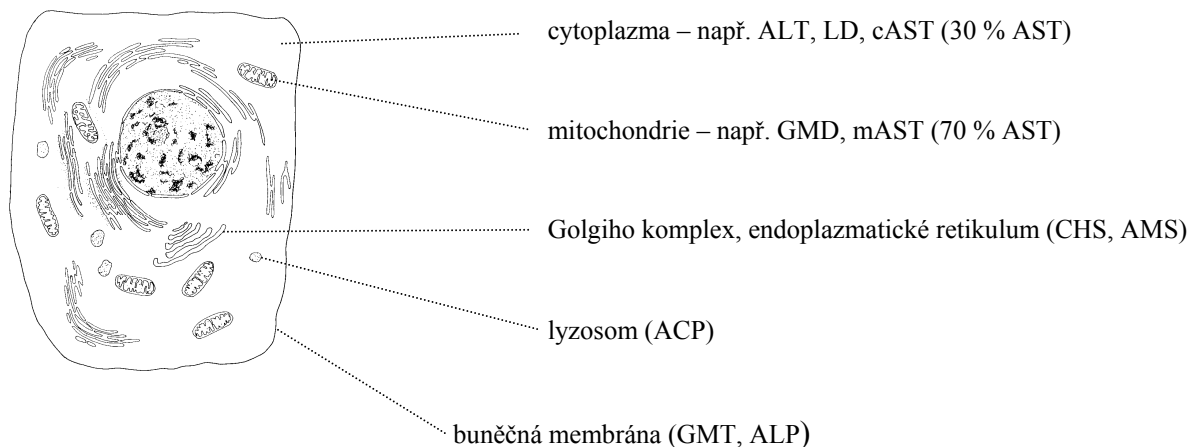
Hladinu enzymu ovlivňuje rychlost jeho odstraňování. Jak již bylo řečeno, nízkomolekulární enzymy (např. α -amylasa) jsou z krve odstraňovány glomeruly filtrací do moče. Většina ostatních enzymů je v plazmě nejdříve inaktivována a poté odstraněna buňkami retikuloendotelového systému receptorově zprostředkovanou endocytózou. Doba, po kterou je enzym v krvi zvýšen určuje jeho biologický poločas. Je to doba za kterou by množství enzymu kleslo na polovinu za předpokladu, že by enzym nebyl do plazmy doplňován ze tkání.

Příklady biologického poločasu některých enzymů jsou uvedeny v tabulce

Enzym	Biologický poločas
ALP	3–7 dní
AMS	9–18 h
ALT	2 d
AST	12–14 h
CHS	10 dní
CK-MB	10 h
GMT	3–4 dny
LD ₁ (HHHH)	4–5 d
LD ₅ (MMMM)	10 h
LPS	7–14 h

S různou hodnotou biologického poločasu je třeba počítat při interpretaci výsledků. Např. poločas AST v plazmě je mnohem kratší než ALT, podobně jako poločas CK je kratší než poločas srdečního izoenzymu LD. Proto tedy v případě jaterního poškození ALT zůstává po několika dnech vyšší než AST, nebo u infarktu myokardu klesá CK k normě velmi rychle, zatímco LD přetrvává delší dobu.

Subcelulární lokalizace některých enzymů v jaterní buňce



Hlavní diagnostické enzymy jaterní buňky jsou lokalizovány v různých oblastech hepatocytu. ALT a cytoplazmatický izoenzym AST se nachází v cytoplazmě. Při membránovém poškození (např. virovém, nebo chemickou látkou) jsou tyto enzymy uvolněny a dostávají se do sinusoidu. Důsledkem je zvýšení hladiny v plazmě. Mitochondriální AST je primárně uvolněna při poškození mitochondrií, např. při působení alkoholu. ALP a GMT se nachází na kanalikulárním povrchu hepatocytů a uvolňují se zejména při cholestáze v důsledku působení žlučových kyselin na membránu. GMT se nachází rovněž v mikrosomech, kde je indukována některými léky. Podávání těchto léků pak zvyšuje hladinu GMT v plazmě.

Využití enzymů v klinické diagnostice

V klinické diagnostice je stanovení enzymů požadováno z důvodu:

- detekce poškození určité tkáně,
- identifikace počátku poškození tkáně,
- stanovení rozsahu poškození,
- odhad závažnosti poškození buněk,
- diagnózy základních onemocnění,
- diferenciální diagnózy onemocnění v rámci poškozeného orgánu.

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 onemocněních 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 izoenzymů.

Makroenzymy

Makroenzymy jsou komplexy tvořené enzymem navázaným na 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 snižena, na rozdíl od situace při např. pankreatitidě, kdy zvýšená hladina amylasy v séru je provázena i zvýšením amylasy v moči.

Tkáňová distribuce diagnosticky významných enzymů

Poškozená tkáň může být diagnosticky nepřímo lokalizována buď ze stanovení aktivity tkáňově specifických enzymů nebo izoenzymů 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.

Orgán	AST	ALT	LD	LD ₁	CK	GMT ⁺	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

⁺ nízká orgánová specifičnost, snadno indukovatelný

Expresí izoenzymů je většinou pro každou tkáň určena geneticky. Proto stanovení izoenzymů v krvi umožňuje identifikovat poškozenou tkáň, z které pocházejí (např. pankreatická lipasa, CK-MB, LD₁).

Klinicky významné enzymy

AST	<i>aspartátaminotransferasa</i>	Příčiny <u>zvýšené</u> aktivity v séru infarkt myokardu; hepatopatie; krevní choroby; svalová poškození
ALT	<i>alaninaminotransferasa</i>	hepatopatie; srdeční onemocnění; alkoholické jaterní choroby, infarkt myokardu virová hepatitida
	poměr $AST / ALT > 1$ $AST / ALT < 1$	
LD	<i>laktátdehydrogenasa</i>	LD _{1,2} – infarkt myokardu, hemolytické anemie; LD ₃ – plicní embolie; LD _{4,5} – hepatopatie, nemoci kosterního svalstva
HBD	<i>hydroxybutyrátdehydrogenasa</i>	aktivita podjednotek H (LD _{1,2}), infarkt myokardu
GMT	<i>gama-glutamyltransferasa</i>	hepatopatie (zánět, alkohol, léky); test chronické konzumace alkoholu; cholestáza
ALP	<i>alkalická fosfatasa</i>	jaterní izoenzym – nemoci žlučových cest; kostní izoenzym – nemoci kostí (Pagetova choroba, rachitis, nádory), <i>fyziologicky zvýšen v období růstu</i>
ACP	<i>kyselá fosfatasa</i>	prostatický izoenzym – tumory prostaty; kostní izoenzym – metastázy tumorů do kostí, marker osteoporózy
CK	<i>kreatinkinasa</i>	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	<i>amylasa (M_r ~ 50 000)</i>	pankreatický izoenzym – akutní pankreatitida; slinný izoenzym – parotitida
LPS	<i>lipasa</i>	akutní pankreatitida; akutní zvrát chronické pankreatitidy
PSA	<i>prostatický specifický antigen</i>	karcinom prostaty
CHE	<i>cholinesterasa</i>	Příčiny <u>snížené</u> aktivity v séru chronické hepatopatie, alkoholicko-toxická hepatitida (intoxikace organofosfáty); ukazatel jaterní proteosyntézy