

KLINICKÁ BIOCHEMIE

Hemoglobin a glykované proteiny Stanovení enzymů

Mgr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D.

plinhart@med.muni.cz

Proteiny

- anémie a polycytémie
- hemoglobin – stanovení v krvi, moči a stolici
- glykované proteiny – stanovení v krvi
- kazuistiky

Anémie

- ↓ hemoglobinu nebo ery pod dolní limit fyziologických hodnot
- ↓ viskozita krve a hypoxie, zvýšený průtok tkáněmi
- ↓ množství hemoglobinu (tím i transportní kapacita krve pro O₂!!!)
- ↓ hematokrit (megaloblastová anémie)
- ↓ počet ery v jednotkovém objemu krve (hypochromní anémie)

Anémie

Anémický syndrom (soubor symptomů)

- bledost kůže a sliznic
- únava a pokles fyzické výkonnosti
- dušnost, bolest hlavy
- klidová tachykardie, palpitace

Adaptace na anémii

- ↑ erytropoéza a srdeční výdej
- ↓ afinity krve ke O_2
- symptomatologie ale velmi záleží na rychlosti s jakou anémie vznikla

Anémie

Klasifikace anémií

morfologická

- počet ery
- velikost ery (normo-, mikro- a makrocytární)
- abnormální tvar ery (např. sférocyty, eliptocyty, poikilocyty, ...)
- hemoglobinizace (normo- a hypochromní)

Anémie

Klasifikace anémií

patogenická

1. snížená produkce

- v důsledku poruchy krvetvorné tkáně (aplastické a., leukémie...)
- nedostatek kofaktorů: Fe (sideropenická), B₁₂, folát, karence bílkovin
- neefektivní erythropoéza - nedostatek nebo rezistence k erythropoetinu (zánět - RA, lidé bez ledvin...)
- anémie chronických chorob

Anémie

Klasifikace anémií

patogenická

2. zvýšené ztráty

- krvácení akut. i chron. (> 500 ml)
- hemolytické
 - poruchy membrány ery, hemoglobinopatie, enzymopatie
 - toxické, autoimunitní (protilátky), infekční látky(malárie)

Anémie

Srpkovitá anémie (normocytární normochromní anémie)

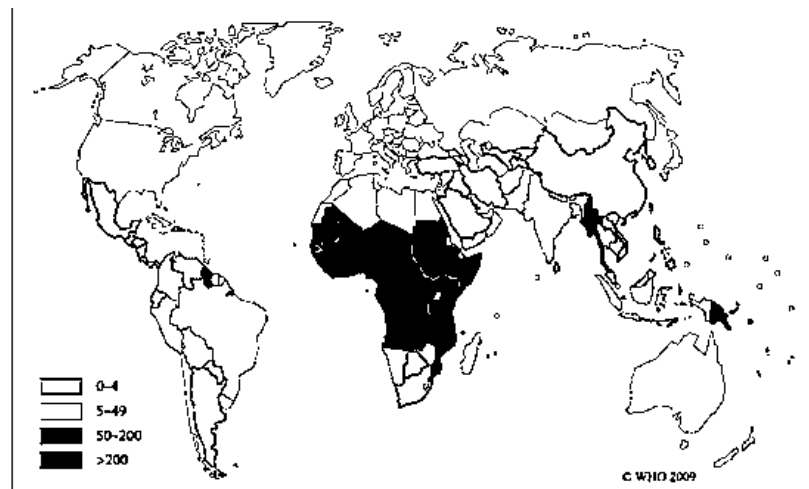
- missense mutace genu pro hemoglobin na 6. pozici v β -řetězci Glu
→ Val (tvorba shluků Hb, a tím změna tvaru ery) → HbS
(nedokonalý transport O_2)
- → místo tetrameru řetězkové aglomeráty **PROČ?** připomínající
strukturu aktinu
- AR - pro homozygoty (obě alely vadné) je to fatální, heterozygoti
dlouhodobě přežívají s příznaky anémie

- Antimalarika – chinin, tetracyklin ATB,...

Anémie

Srpkovitá anémie (normocytární normochromní anémie)

- výskyt vadné alely dobře koreluje s výskytem malárie
- nositelé tohoto genu vykazují větší odolnost vůči parazitu
- pod membránou norm. ery je mnoho vláken aktinu – Plasmodia je využívají, aby přepravily na povrch svůj vlastní protein adhesin (díky němu jsou ery „lepkavé“)
- u srpkovitých ery to však nejde - aktinový můstek je oddělený od zásob adhesinu



Anémie

Anémie (makrocytární anémie)

- větší průměrný objem ery (nad 95 fl = entitní V)
- při hypotyreóze, chronickém jaterním selhání...
- megablastové (deficit kys. listové a B₁₂)
- poruchy syntézy DNA a poruchy maturace jádra → erytroblast zadržen v syntetické fázi b. cyklu → pokračuje syntéza proteinů → větší buňky s ↑ c Hb

Anémie

Anémie (mikrocytární anémie)

- průměrný objem ery pod 80 fl
- normo a hypochromní (nedostatek Fe, β thalassemia major, vit. B₆, otrava Pb...)
- abnormality v produkci Hb (struktura/množství) - talasémie
- vazby Fe v makrofázích při chron. zánětech a nádorech
- nedostatek Fe v důsledku chronického krvácení (nejč. do GIT, menstruace, gravidita, dárci krve...)

- 40-60 ml ztráta krve za 1 menstruační cyklus - fyziologicky vyšší resorpce Fe ze stravy (z 10 na 20-25 %)

- ztráty vyšší než 70-80 ml nutno hradit zvýšeným příjmem

Anémie

Talasémie (mikrocytární anémie)

- vrozená porucha syntézy globinových řetězců (globinopatie – více než 700 typů, většina se klinicky nemanifestuje)
- β_0 thalasemie – chybí β -globinové řetězce a nadbytek α -globinových řetězců poškozují ery vazbou k b. membráně – hemolytická anémie
- ery mají malý objem a jsou hypochromní
- léčba: transfúze – hromadění Fe

- α -talasémie – Afrika, JV Asie
- β -talasémie – Středomoří, Indie, J Čína

Polycytémie

- zmnožení ery v krvi → ↑ viskozity krve (i V krve), může zhoršit krevní oběh – krvácení a trombózy (někdy cyanóza)
- hypoxie, chronická otrava CO ...

Polycythaemia vera

- porucha krvetvorné tkáně, chronické myeloproliferativní onemocnění (↑ c Hb)

Polyglobulie

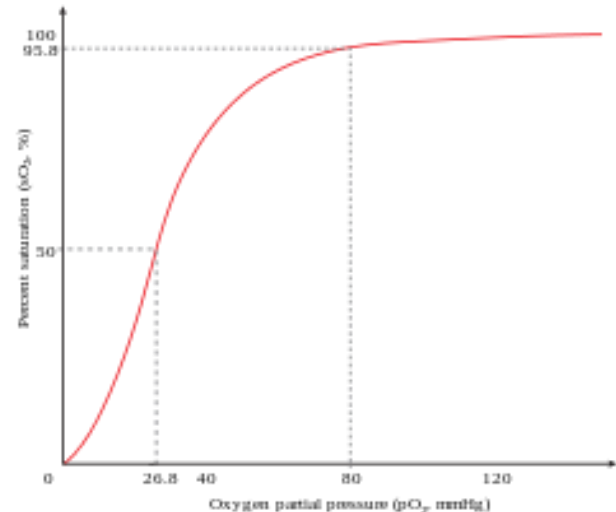
- důsledek vyšší hladiny EPO
- primární: hypoxie (výšky, kuřáci, plicní a srdeční onemocnění), dehydratace vs. sekundární: nádory ledvin
- zhoršuje průtok krve drobnými cévami → cyanóza

Hemoglobin

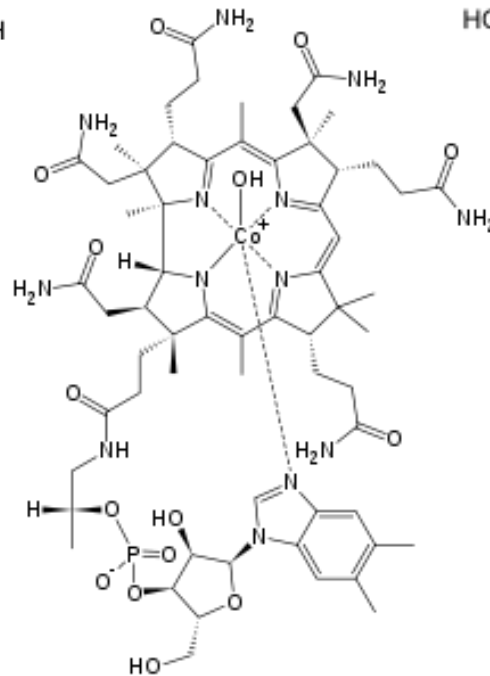
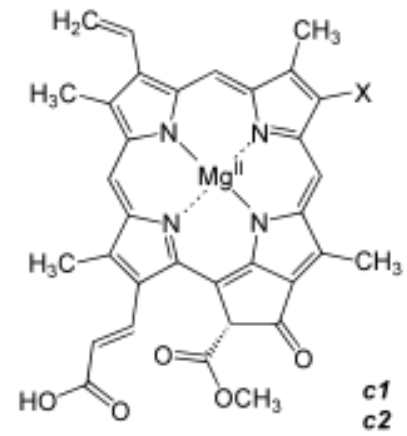
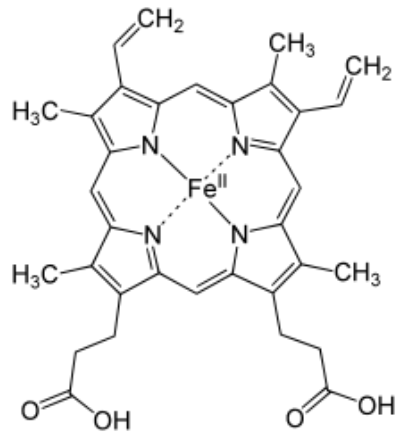
- červené krevní barvivo, které zajišťuje transport O_2 z plic do tkání a transport CO_2 a protonů z periferních tkání do dýchacích orgánů
- c hemoglobinu u zdravého dospělého muže je přibližně 150 g/l, u dospělé ženy asi 140 g/l
- 1 g hemoglobinu může navázat až 1,34 ml O_2
- **tetramerní protein** - globin (dvě a dvě podjednotky jsou identické)
- čtyři typy polypeptidových řetězců α , β , γ , a δ , které se liší počtem a sledem AA
- tetramer je tvořen dvěma α řetězci a dvěma dalšími typy řetězců
- u dospělých převládá hemoglobin A (2x α a 2x β řetězce)

Hemoglobin

- součástí každé podjednotky je polypeptidový řetězec, na který je navázán kovalentně jeden **hem** (konjugovaný protein)
- protoporfyrin, tvořený 4 pyrrolovými jádry spojenými methenylovými můstky s centrálně vázaným Fe
- Fe (šestivazné)
- 4 koordinační vazby s N pyrrolových jader.
- 1 s imidazolovou skupinou histidinu v globinovém řetězci.
- 1 valence pro molekulu O₂



Hemoglobin



Hemoglobin - deriváty

- **Fetální Hb** - během 1. roku života ubývá, dospělí 1 % celkové c
- **OxyHb a DeoxyHb**
- **MetHb** - nemůže vázat O_2 , norma c 1,5 %, ↑ c metabol. acidóza nebo kóma
- **KarboxyHb** – otrava CO_2
- **SulfHb** – degradační produkt v silně kyselém prostředí
- **KarbonylHb** – komplex s CO , 250–300krát silnější než vazba O_2

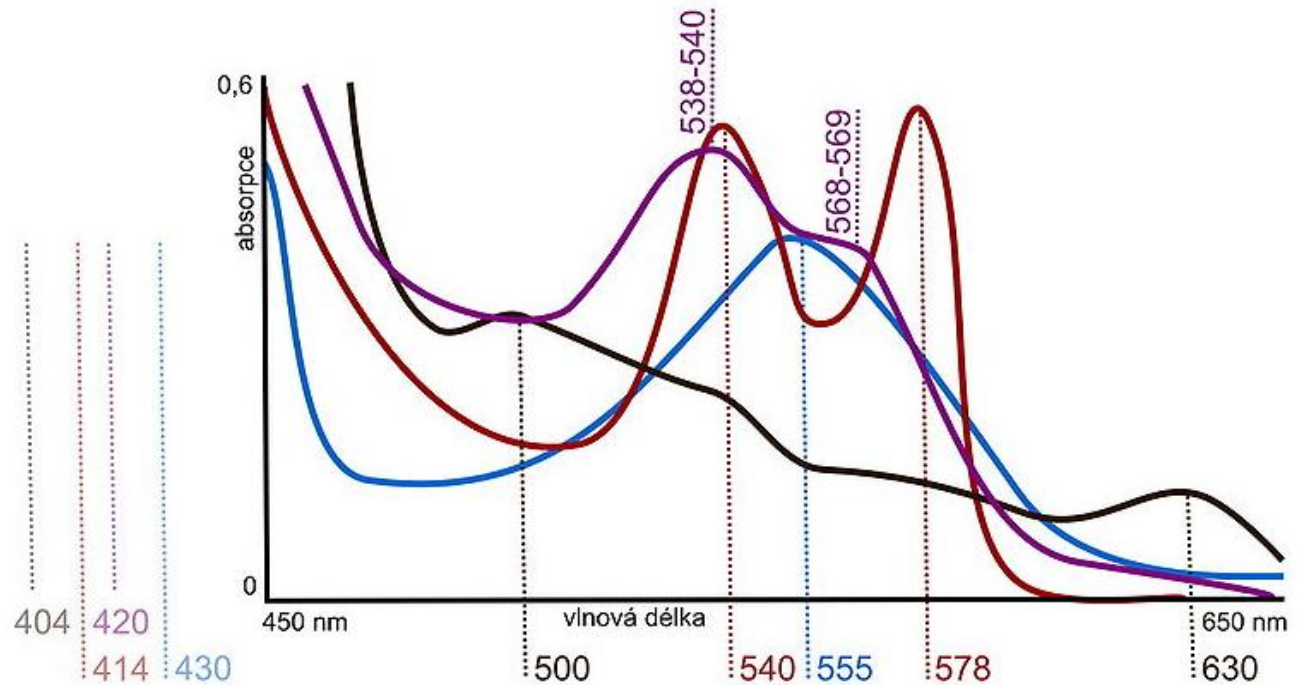
Stanovení derivátů Hb

- v oblasti viditelného světla charakteristická absorpční spektra, kterých se využívá k jejich analýze (oximetry) a rychlé identifikaci
- Hemoproteiny - typická výrazná absorpční maxima v oblasti 400 – 430 nm, tzv. **Soretův pás**
- **OxyHb** má 2 maxima v oblasti 540 a 578 nm
- **DeoxyHb** při 555 nm
- **MetHb** při 630 nm a druhé maximum je závislé na pH a to při 500 nm
- **KyanmetHb** vykazuje široké absorpční spektrum při 540 nm
- Spektrum **karbonylHb** se podobá spektru oxyHb, ale poloha vrcholů je posunuta směrem k nižším vlnovým délkám

Stanovení derivátů Hb

Absorpční spektra Hb a jeho derivátů

oxyhemoglobin deoxyhemoglobin (redukováný Hb) methemoglobin karbonylhemoglobin



Překreslil Petr Menzel, 2011.

Krevní obraz

Hemoglobin (HB)	muži: 134-175 g/l ženy: 120-165 g/l
Hematokrit (HT) = Poměr masy červených krvinek oproti zbytku krevního objemu	muži: 0,40-0,54 ženy: 0,35-0,45
Erytrocyty (RBC)	muži: $4,0-5,3 \times 10^{12}/l$ ženy: $3,8-5,2 \times 10^{12}/l$
Střední objem erytrocytů (MCV)	80-95 fl
Střední hmotnost erytrocytů (MCH)	27-32 pg
Střední koncentrace Hb v erytrocytech (MCHC)	320-370 g/l erytrocytů
Distribuční křivka erytrocytů (RDW)	11,6-15,2 %
Trombocyty (PLT)	$140-440 \times 10^9/l$
Střední objem destičky (MPV)	7,8-11,0 fl
Distribuční křivka destiček (PDW)	15,5-17,1 %
Leukocyty (WBC)	$3,8-10,0 \times 10^9/l$
Diferenciální rozpočet leukocytů	
Segmenty neutrofilní	50-75 %
Tyče	1-5 %
Eozinofily	1-5 %
Bazofily	do 1 %
Lymfocyty	15-40 %
Monocyty	3-10 %

Stanovení Hb v krvi

Invazivní

- z venozního odběru krve
- z kapilárního odběru krve – nejčastější způsob odběru u dárců krve

- bolestivost, infekční riziko, nebezpečný odpad, kalibrace analyzátorů...

Stanovení Hb v krvi

Fotometricky v plné krvi s hexykyanoželezitanem (Drabkin)

- Hb se lyzačním roztokem (hypoton pufr) uvolní z ery
- oxidace hemoglobinu na methemoglobin



- přeměna methemoglobinu na kyanmethemoglobin



- fotometrické stanovení je založeno na oxidaci Fe^{II} v Hb na Fe^{III}
- metHb se v další reakci s KCN přeměňuje na velmi stálý kyanmetHb s jediným širokým absorpčním maximem ve viditelné oblasti při 540 nm

Stanovení Hb v krvi

Fotometricky v plné krvi

- hematologické automaty – po lýze ery – součást stanovení krevního obrazu
- v biochemii – součást ABR analyzátorů – měření absorpce světla v plné krvi (využití rozptylu světla ery)

Identifikace Hb variant

- dříve ELFO
- imunometody, HPLC, kapilární ELFO, MS

Stanovení Hb v krvi

Proužky

- elektrochemická senzorová technologie
- vzorek plné krve je nasáván kapilární činností do reagenční zóny a tam je automaticky přijato konstantní množství vzorku
- Hb ve vzorku plné krve reaguje s reagensy proužku, kde je oxidován mediátor a následně po té, je detekován Hb hemoglobinmetrem, jakmile je ustaven a fixován potenciál mezi elektrodami
- ten je pak průběžně přeměněn na odečitatelnou c Hb
- chemické složení proužku: zvlhčující činidlo (celulóza), pufr, mediátor, smáčedla, aj.

Stanovení Hb v krvi

Neinvazivní

Okluzní spektrofotometrie

- shodná jako s pulzní oxymetrií
- spektrální analýza světla procházejícího krví nasycené O_2 = detekce množství složek obsažených v krvi v závislosti na jejich absorpci
- kombinace 2 technologií:
 - spektrofotometrie - měří množství hemoglobinu nasyceného kyslíkem (k rozlišení Hb od ostatních krevních složek se využívá vlnové délky 600-940 nm).
 - pletysmografie - měří pulzační změny objemu arteriální krve
- měřicí sonda vytváří mechanické pulsy, které mění dynamiku krve v prstu, což zesiluje průchod optického signálu optického signálu
- c Hb se pak stanoví z řady postupných okluzí (impulzů) během daného m daného měření

Stanovení Hb v moči

- močí zcela zdravých lidí se vyloučí až milion ery/den (2 – 3 ery/ μ l)
- Patologický nález:
 - **hematurie**, erythrocyturie nebo průnik volného Hb, příp. svalového myoglobinu, do definitivní moči (**hemoglobinurie**, resp. myoglobinurie)

Makroskopická hematurie

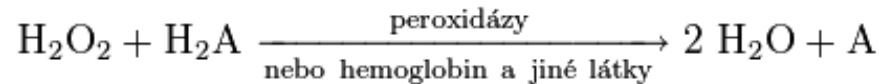
- pozorujeme pouhým okem; moč má narůžovělé zbarvení (průnik ery přes glomer. membr. při zánětu, ruptura cévky, krvácení)
- spektroskopicky v ní lze prokázat Hb (nejméně 1 g Hb/l)
- u masivní hemoglobinurie může mít moč až zbarvení černého piva (degradace hemoglobinu na hematin)

Hemoglobinurie

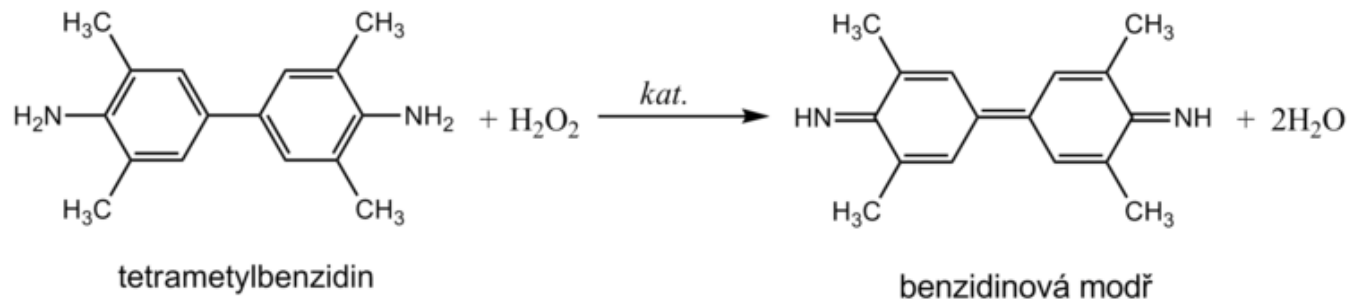
- intravaskulární hemolýza, při transfúzi inkompatibilní krve nebo paroxysmální hemoglobinurii

Stanovení Hb v moči

- Hb katalyzuje oxidaci (dehydrogenaci) některých substrátů (např. derivátů benzidinu) peroxidem vodíku



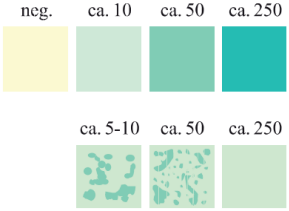
- nejedná se o enzymovou aktivitu (katalýzu podmiňuje hemové Fe), a proto se neztrácí ani po tepelné denaturaci
- **pseudoperoxidázová aktivita**, která se využívá k citlivým, ale nespecifickým důkazům Hb nebo stopových množství krve
- ke sledování reakce - chromogenní substrát



Stanovení Hb v moči

Proužky

- reagenční zóna obsahuje chromogen se stabilizovaným peroxidem vodíku
- v přítomnosti volného Hb (**hemoglobinurie**) se indikační zóna zbarví rovnoměrně modře
- pokud jsou v moči přítomny ery (**erythrocyturie**), vytvářejí se intenzivně zelenomodře zbarvené tečky až skvrny

Regent pad	Abbreviation	Units	Time of evaluation after	Colour scale	Principle of the test	Sensitivity	
						SI	Conv.
Haemoglobin	HEMO	Ery/ μ l	ca 60 s		oxidation of chromogene by the organic hydroperoxide in the present of the haemoglobine	5 Ery/ μ l	
Erythrocytes							

- FP: menses, gyn. onem., dieta (řepa), léky (rifampicin), kys. askorbová

Stanovení Hb ve stolici

- průkaz okultního (skrytého) krvácení ve stolici slouží k záchytu časných fází kolorektálního karcinomu, kdy je možná radikální a efektivní léčba

Metody využívají **pseudoperoxidázové aktivity** Hb

- pacient musí držet 3 dny před vyšetřením dietu, vyloučit ze stravy nedovařené maso, salámy, banány, rajčata, nesmí užívat léky obsahující kys. askorbovou nebo acetylsalicylovou. Poté si pacient sám odebírá vzorky ze tří po sobě jdoucích stolic a aplikuje je na testovací karty. Vyhodnocení se provádí v lab.

Metody jsou založeny na **imunochemickém průkazu** Hb

- pomocí protilátky proti lidskému Hb
- citlivější a specifitější, není zapotřebí držet před vyšetřením dietu

Pozitivní výsledky musí být ověřeny dalšími diagnostickými metodami

Glykovaný hemoglobin

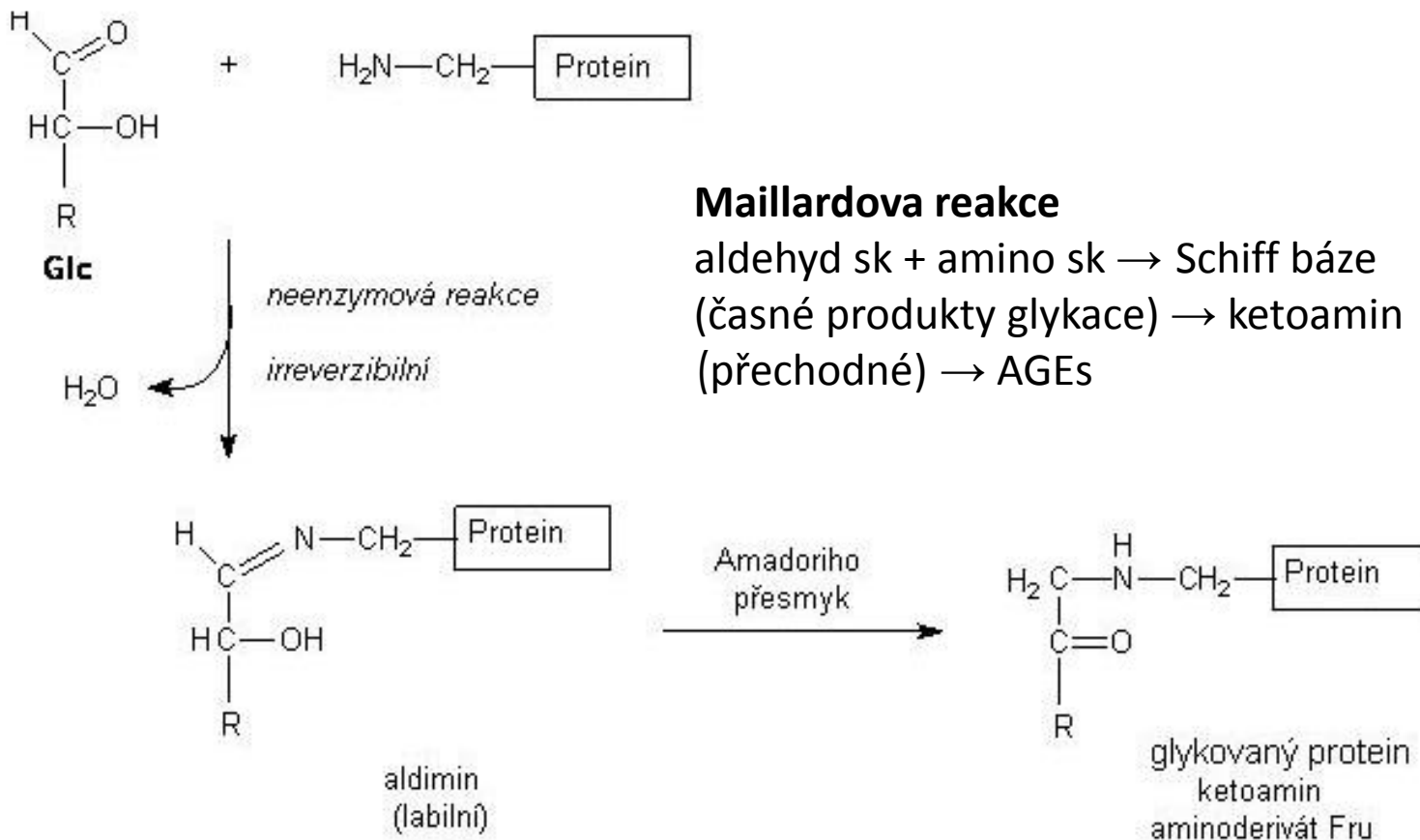
- HbA1c, který se tvoří neenzymatickou reakcí glukózy a nativního Hb (volné amino skupiny v molekule, ve všech sérových proteinech, především kolagen, elastin, myelin nervů) – ireverzibilní reakce
- tento proces probíhá kontinuálně po celou dobu života ery **JAK DLOHO?**
- poměr glykace je přímo úměrný c glukózy v krvi
- c HbA1c udává průměrnou c glu v krvi za předešlých 6 až 8 týdnů (díky kinetice přeměny ery je toto časové období více ovlivňováno c glu v krvi než délkou uplynulého času)
- **VYUŽITÍ?**

Glykovaný hemoglobin

- stanovení produktů glykace Amadoriho typu je vhodným ukazatelem dlouhodobé c glu a poskytuje **nepřímou informaci o průběhu glykemií v časovém období, které odpovídá biologickému poločasu bílkoviny (glykovaný Hb a glykované proteiny)**

Glykovaný hemoglobin

Princip neenzymové glykace proteinů



c vzniklých **fruktózaminů** můžeme stanovit reakcí s nitrotetrazoliovou modří

Glykovaný hemoglobin

- cHbA1c (stabilní frakce) závisí také na celkové c Hb - **HbA1c je udávána jako % c Hb**
- referenční meze u zdravých dospělých **2,8–4,0 %**, u diabetiků svědčí koncentrace HbA_{1c} do 4,5 % o vynikající kompenzaci diabetu, do 6,0 % o přijatelné a vyšší hodnoty o neuspokojivé kompenzaci diabetu
- **falešně nízké hodnoty** (nízký HbA1c přestože je vysoká c glu) se mohou objevit u pacientů se zkrácenou dobou života ery (**hemolytické onemocnění**) nebo významnou nedávnou **ztrátou krve** (vysoký podíl „mladých“ erytrocytů)
- **falešně vysoké hodnoty** (vysoký HbA1c přestože je normální c glu) jsou uváděny při **anémii železa** (vysoký podíl „starých“ ery)

Stanovení HbA1c v krvi

Iontoměničová afinitní chromatografie s následnou spektrofotometrií

- lyze ery
- vazba Hb na boronát
- separace glykované frakce Hb od neglykované
- fotometrické stanovení jednotlivých frakcí

HPLC

Imunoturbidimetrické stanovení

- pomocí obohacených částic
- HbA1c je stanovován přímo bez měření celkového Hb
- na základě lineární korelace mezi HbA1c a průměrnou c glu, lze hodnoty HbA1c přepočítat na průměrnou c glu

Stanovení HbA1c v krvi

Imunoturbidimetrické stanovení

- celkový Hb a HbA1c v hemolyzované krvi se vážou se stejnou afinitou na částice v R1
- navázané množství odpovídá relativní c obou složek v krvi
- myší monoklonální Ab proti lidskému HbA1c (R2) váže částice s navázaným HbA1c
- kozí polyklonální Ab proti myšímu IgG (R3) reaguje s monoklonální myší Ab proti lidskému HbA1c za vzniku aglutinace
- měřená absorbance odpovídá navázanému HbA1c na částice, což je převedeno na % HbA1c ve vzorku

Stanovení HbA1c v krvi

- stanovení specifické pro lidský HbA1c
- monoklonální myší Ab nevykazují zkříženou reaktivitu s karbamylovaným Hb a acetylovaným Hb
- není ovlivňováno kyselinou askorbovou do 3,4 mmol/l
- konjugovaným a nekonjugovaným bilirubinem do 1026 μ mol/l
- lipémií do 22 mmol/l triacylglycerolů
- RF do 250 IU/ml
- nebyla pozorována interference způsobená urémií, nestabilními produkty (Schiffova báze)
- alkoholismus a užití větší dávky aspirinu mohou vést k rozporným výsledkům
- FP nebo FN dle typů

Kazuistika

- muž, 53 let, diabetik, s horečkou, nehojící se defekt na pravé končetině

Anamnéza

- RA: matka nežije, sestra 42 let zdravá
- OA: operace 0, úrazy 0, inzulin
- AA: 0
- SA: Pracuje jako elektrikář
- NO: 4 dny teplota do 39 °C, celková malátnost, bolest a otok pravé nohy – hnisavá rána, škrábl se před měsícem drátem
- LAB: ↑ hodnoty ledvinového selhání a zánětlivých markerů

Kazuistika

- muž, 53 let, diabetik, s horečkou, nehojící se defekt na pravé končetině
- LAB: ↑ hodnoty ledvinového selhání a zánětlivých markerů
- **Hospitalizace**
- Terapie: širokospektrální ATB
- 9. den - nečekaný kolaps pacienta se ztrátou vědomí a komorovou fibrilací
- úspěšná kardiopulmonální resuscitace
- flegmóna pravé dolní končetiny a vývoj syndromu systémové zánětlivé odpovědi (systemic inflammatory response syndrome – SIRS) a syndrom multiorgánového selhání (multiple organ dysfunction syndrome – MODS)
- pacient byl akutně hemodialyzovaný a ATB léčba byla změněna na cílenou
- 40. den –kardiopulmonální selhání - exitus

Kazuistika

Otoky dolních končetin

Které z níže vyjmenovaných onemocnění považujete za možnou příčinu obtíží?

- A) Lymfadenopatie
- B) Diabetes mellitus
- C) Plicní embolie
- D) Nefrotický sy
- E) Thyreopatie
- F) Infarkt myokardu

Kazuistika

Otoky dolních končetin

Jak budeme tuto nemocnou léčit?

- A) Symptomatickou a podpůrnou léčbou
- B) Kontrolou DM
- C) Kontrolou TK
- D) Chirurgicky
- E) Hormonální substitucí

Kazuistika

- žena, 65 let, omdlela ráno v parku, když si šla koupit snídani

Anamnéza

- RA: matka měla cukrovku, otec zemřel na infarkt
 - OA: dosud vážněji nestonala, běžné bronchiální infekce, operace 0, úrazy 0, porod 2, léky trvale nebere
 - AA: 0
 - SA: v důchodu (pracovala jako sekretářka)
 - NO: dnes upadla do bezvědomí při procházce v parku, nesnídala, neví, jak dlouho nebyla při vědomí, kolemjdoucí zavolal záchrannou službu, která paní stabilizovala, nyní je hospitalizována
-
- hypoglykemický šok – **PROČ?**

Kazuistika

- žena, 64 let, častá bolest hlavy, diagnóza: zvýšená glykémie, TK 140/100, BMI 30

Anamnéza

- RA: matka i otec zemřeli při nehodě
- OA: dosud vážněji nestonala, běžné bronchiální infekce, operace 0, úrazy 0, porod 3, léky trvale nebere
- AA: 0
- SA: v důchodu (pracovala jako sekretářka), zemřel jí letos manžel

- odeslána k internistovi: metabolicky sy – ↑CHL , ↑ TK, ↑ c glu

- terapie: antidiabetika, po roce přechod na inzulín

- další vývoj: neuropatie, přestala chodit, ztráta rovnováhy, oční katarakta, atrofie mozku, po 7 letech zemřela

	T1DM	T2DM
Věk	obvykle pod 30	obvykle nad 30
Častost (% všech diabetiků)	10–20 %	80–90 %
Vznik symptomů	akutní nebo subakutní	pomalý
Obezita	není obvyklá	velmi častá
Vyvolávající faktory	změněná imunitní reakce po virové infekci	obezita, těhotenství, stres
Obsah pankreatického insulinu	nepřítomen nebo stopy	nízký, normální, vysoký
Glukagon v plasmě	vysoký, ale potlačitelný insulinem	vysoký, ale rezistentní na insulin
Protilátky proti pankreatickým ostrůvkům	přítomny u 85 % případů	méně než u 5 %
Primární rezistence na insulin	minimální	obvykle výrazná
Odpověď na léčení insulinem	+++	+ až -
Odpověď na dietní léčbu samotnou	nepatrná	vždy přítomna, ale různého stupně
Odpověď na léčbu perorálními antidiabetiky	nepřítomná	přítomná
Obvyklé akutní komplikace	ketoacidóza	hyperosmolární kóma
Sdružení s HLA	ano	ne

Kazuistika

T1DM

- příklady, kdy nebyl T1DM u dětí rozpoznán včas
- symptomy diabetické ketoacidózy byly mylně interpretovány jako projev jiné nemoci

Kojenec

- opakované respirační infekty
- v anamnéze byla alterace celkového stavu s výraznou tachypnoe považována za onemocnění bronchiolitis acuta

Batole

- Kussmaulovo dýchání vedlo k diagnóze bronchopneumonie
- acidotické zbarvení sliznic, kvasinkový exantém v dutině ústní a potíže při polykání při dehydrataci byly hodnoceny jako angína

Kazuistika

T1DM

- příklady, kdy nebyl T1DM u dětí rozpoznán včas
- symptomy diabetické ketoacidózy byly mylně interpretovány jako projev jiné nemoci

Dítě – dívka, 8 let

- dehydratovaná, bolesti břicha a opakované zvracení
- byla po předchozím chirurgickém vyšetření pro možnou náhlou příhodu břišní odeslaná k hospitalizaci s diagnózou gastroenteritis acuta
- **Včasné vyšetření glykémie mohlo zabránit u dětí výraznému rozvratu vnitřního prostředí!!!**

Enzymy

- Metoda konstantního času
- Metoda tangent
- Hmotnostní koncentrace

- Aminotransferázy: AST, ALT
- LD, HBD, ACP
- CK
- ALP
- GGT
- AMS
- LPS
- CHE
- Enzymy v moči

- Kazuistiky

Enzymy

- slouží jako **indikátory patologických procesů** (stanovují se katalytické c konkrétních enzymů → diagnóza či průběh terapie)
 - plasmatické (sérové) enzymy, často i enzymy obsažené v moči (amyláza)
- **specifická činidla pro stanovení různých analytů** (pomocí enzymů se specificky stanoví c látek – diagnostické soupravy)
- **používají se k léčbě** (např. trávicí enzymy)

Enzymy

Obecná enzymologie

- „enzymé“ = řecky z kvasnic (1. izolovaný E z kvasnic katalyzující kvašení cukrů – zymáza)
 - **biokatalyzátory bílkovinného charakteru** (snižují aktivační energii potřebnou pro chemickou reakci, katalyzují přeměnu S na P)
 - apoenzym (bílkovinná část) + koenzym (nebílkovinná část, deriváty vitamínu B)
 - **specifičnost:** 1. substrátová, 2. funkční (typ reakce)
 - **faktory ovlivňující chemickou reakci:**
 - T (optimum 37°C)
 - pH (optimum obvykle 7-8)
 - aktivátory (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+})
 - inhibitory (těžké kovy – Hg, Pb, léky, jedy)
 - c S a koenzymu
- často se volí kompromis mezi optimálními podmínkami, cenou, technickými požadavky

Enzymy

- **stanovení:** krev, moč, stolice, sekrety GIT, výpotek, likvor, ery, tkáň...

E aktivita = katalytická c

- množství E katalyzujícího přeměnu S na P v čase za definovaných podmínek, vztaženo na objem 1 l)
- **„kinetické a dvoubodové metody“** – fotometrické sledování časové změny absorbance
- katal (kat)...mol/s, U (IU)..... μ mol/min
- **1 μ kat/l = 60 U/l, 1U/l = 0,0167 μ kat/l = 16,7 nkat/l**

Hmotnostní koncentrace = „mass concentration“

- imunochemicky (specif. Ig)
- g/l (mg/l, μ g/l)

Enzymy

E aktivita = katalytická c

- „dvoubodové metody (metoda zastaveného času)“
- fotometrické sledování změny A (přírusek P nebo úbytek S) za časovou jednotku (nevíme, co se v reakční směsi děje!)
- většinou v daném čase zastavujeme enzymovou reakci (např. denaturace a kolorimetrické vybarvení produktů)

$$\Delta A / \Delta t = \frac{A_2 - A_1}{t_2 - t_1}$$

Enzymy

E aktivita = katalytická c

- „kinetické metody (metoda tangent)“
- fotometrické sledování tvorby produktu nebo úbytku substrátu v čase (dA/dt)
- podmínka: konstantní rychlost (kinetika 0.řádu) a **vždy kontrolovat průběh reakce!** (t.j. rychlost reakce)
- optický test (Warburgův) (NADH + H⁺) 340 nm
- chinoniminová reakce (křenová peroxidáza)

$\text{H}_2\text{O}_2 + 4\text{-aminoantipyrin} + \text{subst. fenol} \rightarrow \text{chinonimin (červený, 555 nm)}$

- hydrolýza (x)nitrofenyl-derivátů substrátu (žlutý (x)nitrofenol, ~ 420 nm)

Enzymy

Hmotnostní koncentrace = „mass concentration“

- sendvičový princip - celková doba stanovení: **18 minut**

1. inkubace: 10 μ l vzorku, **biotinylovaná monoklonální protilátka** proti AFP a **monoklonální protilátka proti AFP značená rutheniovým komplexem** reagují a vytváří sendvičový komplex.

2. inkubace: Po přidání mikročastic, potažených streptavidinem, se komplex váže na pevnou fázi prostřednictvím interakce mezi biotinem a streptavidinem.

3. detekce: Reakční směs je nasáta do měřící komůrky, kde jsou mikročástice zachyceny magnetickým polem na povrchu elektrody.

Enzymy

Hmotnostní koncentrace = „mass concentration“

- nenavázané složky jsou odstraněny promývacím roztokem
- přivedené napětí na elektrodě vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů, která je změřena fotonásobičem

Enzymy

- **biologický poločas ($t_{1/2}$):** doba, za jakou poklesne aktivita E na $\frac{1}{2}$, nebyl-li by E do krve doplňován z tkání – h, dny, týdny
- **izoenzymy:** liší se primární strukturou (pořadím AA), orgánová specificita, odlišné fyz., chem. i imunolog. vlastnosti, stanovení – elektroforeticky, chromatograficky, imunologicky....
- **izoformy:** nepravé izoenzymy, liší se obsahem cukrů v molekule
- **makroenzymy:** vazba Ig na molekulu enzymu nebo polymery enzymu, větší molekula a delší $t_{1/2}$, např. AMS, CK, AST...(benigní, autoimun. on., malignity)

Enzymy

Dělení E dle různého obsahu v tkáních (orgánech)

- s řádovým rozdílem v různých tkáních
- ubikvitérní (všudypřítomné)

V plazmě

- normálně přítomné a mající zde svou úlohu (např. enzymy kaskády krevního srážení nebo cholinesterasa)
- uvolňované z buněk různých tkání, které nemají v plazmě žádnou funkci a za fyziologických okolností je jejich c nepatrná

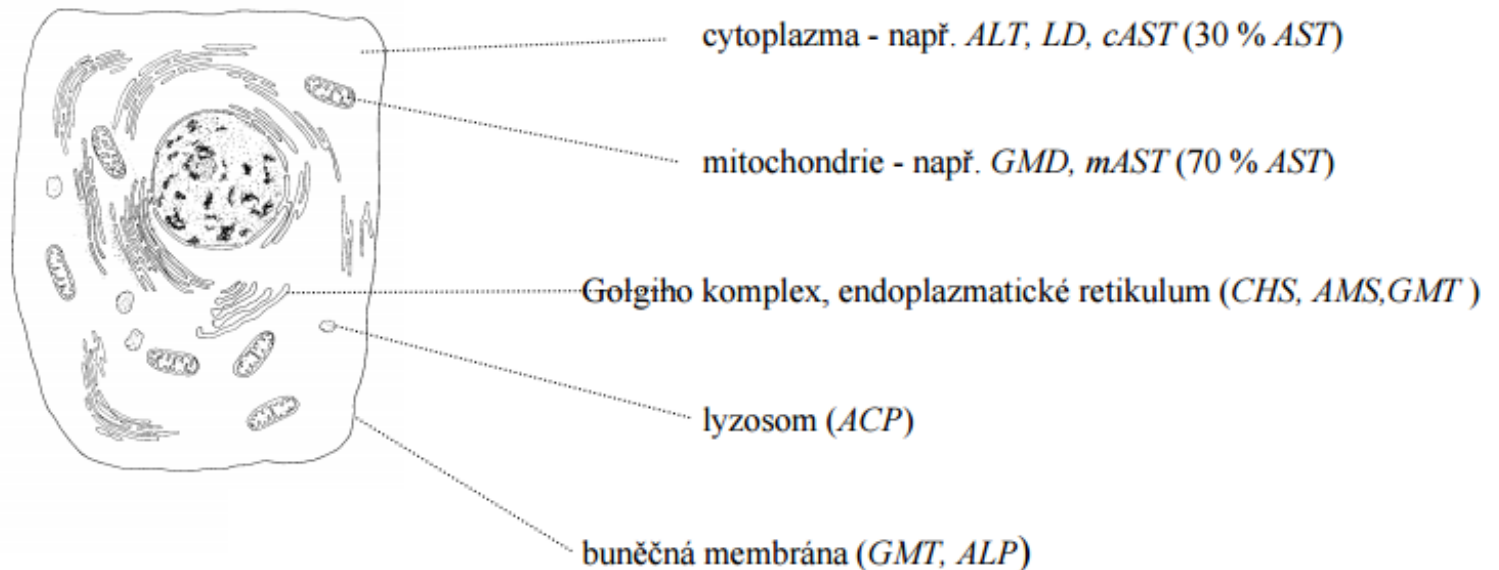
Enzymy

Dělení E dle místa vzniku a účinku

- **buněčné** - enzymy buněčných metabolických dějů a jsou buď rozpuštěny v cytoplazmě nebo jsou vázané na buněčné struktury
 - cytopl. (ALT, LD, CK, AST 30%), mitochondrie (AST 70%, CK), b. membrána (ALP, GMT)...
- **sekreční** - enzymy secernované buňkami žláz do extracelulárního prostoru, nikoliv však do plazmy (typicky trávicí enzymy)
 - AMS, LPS, EL, CHS
- u „zdravých“ lidí nacházíme v krvi velmi nízká množství obou typů enzymů, v buňce je c řádově 1000 – 10 000krát vyšší

Enzymy

Subcelulární lokalizace některých E v jaterní b.



Enzymy

Hlavní diagnostické enzymy jaterní buňky

- ALT a cytoplazmatický izoenzym AST jsou při membránovém poškození (např. virovém, nebo chemickou látkou) uvolněny a dostávají se do sinusoidů
- 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 důsledky působení žlučových kyselin na membránu
- GMT se nachází rovněž v mikrosomech, kde je indukována některými léky

Enzymy

Příčiny zvýšené aktivity buněčných enzymů v plazmě

- patologické uvolňování E 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 fosfolipázy a odbourání fosfolipidů cytoplazmatické membrány vede k jejímu „proděravění“
- důsledkem je průnik makromolekul z cytoplazmy do extracelulárního prostoru a odtud do krve

Enzymy

Příčiny zvýšené aktivity buněčných enzymů v plazmě

- **zvýšená syntéza** - např. při zvýšené aktivitě osteoblastů při růstu kostí se v krvi zvyšuje hladina alkalické fosfatázy (ALP)
- proto u dětí jsou referenční hodnoty ALP v plazmě vyšší (3-7krát) než u dospělých
- užívání některých léků a alkoholu indukuje zvýšenou syntézu jaterních enzymů GMT a ALP

Enzymy

Příčiny zvýšené aktivity buněčných enzymů v plazmě

- **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 ALP do lymfy a následně může být dočasně zvýšena hladina enzymu i v krvi
- řada jaterních enzymů (ALP, GMT, 5'-nukleotidáza, leucinaminopeptidáza) je vázána na povrchu hepatocytů, které jsou v kontaktu se žlučovými kanálky, pak ↑ c žlučových solí při zadržení odtoku žluče může vyvolat uvolnění membránových fragmentů s navázanými enzymy do cirkulace

Enzymy

Příčiny zvýšené aktivity buněčných enzymů v plazmě

- **nedostatečné odstraňováním z cirkulace**
- např. malé enzymy, amyláza a lipáza, jsou z oběhu odstraňovány glomerulární filtrací - renální selhání zvyšuje jejich hladinu
- proti některým enzymům se v krvi vytváří Ab a dochází ke tvorbě komplexů enzym-protilátka (tzv.makroenzymy) → poločas enzymu v krvi potom kopíruje poločas Ig (3 týdny)

Enzymy

- časový průběh nárůstu a poklesu enzymové aktivity v plazmě ovlivňuje řada faktorů
- při buněčné smrti se defekty v buněčné membráně prohlubují s časem → 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 nekróze buněk

Enzymy

- při buněčné smrti způsobené infarktem, při kterém je přerušen přítok krve do určité části orgánu, musí enzymy z poškozených buněk nejprve difundovat z neperfundovaných oblastí než se objeví v cirkulaci
- proto např. nárůst CK v krvi při infarktu je zpožděn pokud nejsou artérie reperfundovány účinkem trombololytik
- množství enzymu v krvi je úměrné počtu poškozených buněk
- např. u infarktu myokardu je množství CK v plazmě úměrné velikosti infarktu

Enzymy

- 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

Enzymy

- 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.

Enzymy

- c enzymu ovlivňuje rychlost jeho odstraňování
- nízkomolekulární enzymy (např. α -amyláz) 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 (doba za kterou by množství enzymu kleslo na polovinu za předpokladu, že by enzym nebyl do plazmy doplňován ze tkání)

Enzymy

Enzym	Biologický poločas
ALP	8-10 dní
AMS	12 hod
ALT	47 hod
AST	17 hod
CHE	10-12 dní
CK-MB	12 hod
GGT	4 dny
LD1	3-5 dní
LD5	10 hod
LPS	7-15 hod

Enzymy

- 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

Enzymy

Využití enzymů v klinické diagnostice

- 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

Enzymy

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)
- z přítomného spektra enzymů v krvi (např. při těžkém poškození jaterního parenchymu doprovázeném nekrózou buněk je zvýšení aktivity enzymů v krvi $LD > AST > ALT$)
- výpočtu poměru aktivit enzymů (např. dle poměru aktivit AST/ALT v séru lze odlišit počáteční obstrukční ikterus (< 1) od aktivní chronické hepatitidy (> 1)
- stanovení izoenzymů

Enzymy

- 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 17 h)/ALT (poločas 47 h)** napomáhá rozlišení typu hepatitidy - 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).

Enzymy

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
- exprese izoenzymů je většinou pro každou tkáni určena geneticky

Enzymy

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 specifíčnost, snadno indukovatelný

Aminotransferázy

- katalyzují přenos aminoskupiny z AA na ketokyseliny - MTB AA a urey

ALT = alaninaminotransferáza, dříve GPT

- specifický pro ala

AST = aspartátaminotransferáza, dříve GOT

- specifický pro aspartát

poměr AST / ALT

- **> 1** alkoholické jaterní choroby, infarkt myokardu
- **< 1** virová hepatitida

AST

AST = aspartátaminotransferáza, dříve GOT

- **kosterní svalstvo, srdce, játra, ledviny**, ery...cytoplazmě všech b. (25 %) a mt (75 %)
- při změně permeability buněčné membrány hepatocytu dojde k uvolnění menší cytoplazmatické frakce (spolu s ALT), což vede k mírné elevaci v plazmě
- větší mitochondriální frakce je uvolněna jen při nekróze hepatocytu
- onem. myokardu (nekróza, AIM), onem. kosterního svalstva (rhabdomyolýza, extenzivní svalová námaha), hepatopatie, krevní choroby, svalová poškození
- stanovení aktivity AST, podobně jako ALT, nemá prognostický význam

AST

Dvoustupňová reakce

Enzymová (AST): L-aspartát + 2-oxoglutarát → oxalacetát + L-glutamát

Indikační reakce (MD): oxalacetát + **NADH + H⁺** → L-malát + NAD⁺

- aktivitu AST stanovíme kineticky na základě rychlosti úbytku NADH v průběhu reakce měřením absorbance při 334, 340 nebo 365 nm
- katalytická koncentrace AST je úměrná poklesu absorbance

Saturace AST: pyruvát + NADH + H⁺ → L-laktát + NAD⁺

Redukce pyruvátu: pyridoxal-5-fosfát + ApoAST → AST*

AST

Dvoustupňová reakce

- doporučuje se preinkubace 10 min při 37°C v reakční směsi bez 2-oxoglutarátu
- po krátké lag fázi je monitorována ΔA odečítáním absorbance v minutových intervalech po dobu několika minut nebo kontinuálním sledováním
- protože počáteční absorbance reakční směsi má vyšší hodnotu, doporučuje se provádět odečet proti slepé zkoušce, kterou může být např. roztok dvojchromanu draselného
- kalibrace: enzymový kalibrátor nebo teoretický faktor

ALT

- **játra**, kosterní svalstvo (10x méně), ery (4x méně než AST)...v cytoplazmě všech b.
- k uvolnění ALT do krevního oběhu může dojít již při zvýšené permeabilitě buněčné membrány hepatocytu většinou následkem zánětu, ischemie nebo toxického poškození
- hepatopatie (parenchymového poškození bez nekrózy hepatocytů, infekční hepatitidy, ischemie, toxické, akutní ostrukční), onem žluč. cest, dekompenzované srdeční vady (venostasa v játrech)
- stanovení aktivity ALT nemá prognostický význam

ALT

Dvoustupňová reakce

Enzymová (ALT): L-alanin + 2-oxoglutarát → pyruvát + L-glutamát

Indikační (LD): pyruvát + **NADH + H⁺** → L-laktát + NAD⁺

pyruvát (endogenní) + NADH + H⁺ → L-laktát + NAD⁺

pyridoxal-5-fosfát + ApoALT → ALT*

Enzymy

Vyšetření aldolázy, LD, HBD a ACP je již dnes považováno za obsoletní!

LD

LD = laktátdehydrogenáza, dříve LDH

- katalyzuje přeměnu pyruvátu na laktát (anaerobní glykolýza, ox-red)
- **ve všech tkáních** – játra, kosterní sval, srdce, ledviny, GIT, mozek, **nádory**, ery, lymfat. uzliny...
- 5 izoenzymů: *LD1-5* (podjednotky H-heart, M-muscle)
- LD1 (H₄),2 (H₃M) - infarkt myokardu, hemolytické anemie
- LD3 (H₂M₂) - plicní embolie
- LD4 (H_M3),5 (M₄) - hepatopatie, nemoci kosterního svalstva

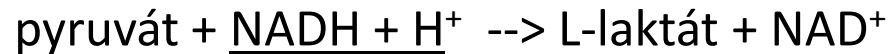
ELFO

- $\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{tetrazoliová sůl (NBT, INT)} \rightarrow \text{NAD}^+ + \downarrow \underline{\text{FORMAZAN}}$

LD

LD = laktátdehydrogenáza, dříve LDH

- katalyzuje přeměnu pyruvátu na laktát (anaerobní glykolýza, ox-red)

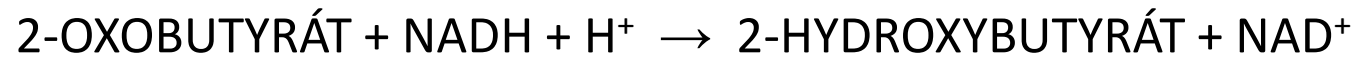


- **ve všech tkáních** – játra, kosterní sval, srdce, ledviny, GIT, mozek, **nádory**, ery, lymfat. uzliny...
- 5 izoenzymů: *LD1-5* (podjednotky H-heart, M-muscle)
- LD1 (H₄),2 (H₃M) - infarkt myokardu, hemolytické anemie
- LD3 (H₂M₂) - plicní embolie
- LD4 (H_M3),5 (M₄) - hepatopatie, nemoci kosterního svalstva

HBD

HBD = hydroxybutyrátdehydrogenáza (odpovídá LD 1,2)

- srdce, ery, mozek
- aktivita podjednotek H (LD1,2), infarkt myokardu



ACP

ACP = kyselá fosfatáza

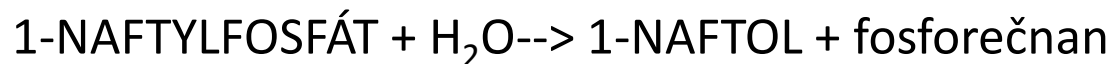
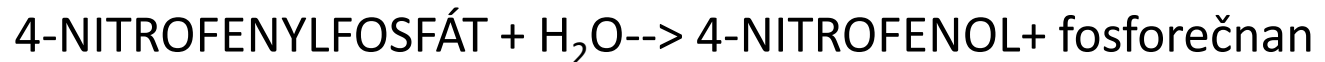
- katalyzuje štěpení esterů k. fosforečné v kys. prostředí (pH 5)
- **prostata, kost**, ery, trom, leu
- 2 izoenzymy (po inhibici vinannem – tartarátém):
- ACP není v séru/plazmě stabilní - *tartarát labilní* (prostata, leu), *tartarát stabilní* (kost, ery, trom)
- prostatický izoenzym - tumory prostaty, kostní izoenzym - metastázy tumorů do kostí, marker osteoporózy

- ACP je pro dg.ca prostaty nahrazováno imunochemickým stanovením **PSA**
- **PSA** prostatický specifický antigen serinová proteasa, karcinom prostaty

ACP

ACP = kyselá fosfatáza

- katalyzuje štěpení esterů k. fosforečné v kys. prostředí (pH 5)
- **prostata, kost**, ery, trom, leu
- 2 izoenzymy (po inhibici vinannem – tartarátem):
- *tartarát labilní* (prostata, leu), *tartarát stabilní* (kost, ery, trom)
- prostatický izoenzym - tumory prostaty, kostní izoenzym - metastázy tumorů do kostí, marker osteoporózy
- pH < 7,0



- detekce prostatického izoenzymu: ACP - ACP inhibovaná vínannem

CK

CK = kreatinkináza

- katalyzuje fosforylaci kreatinu → energetika svalů
- **kosterní svalstvo, srdce, mozek**, hladké svalstvo – děloha, žaludek, střevo, ledviny, plíce...
- 4 izoenzymy – MM, MB, BB (M- muscle, B – brain) a mt
- v současné době je doporučeno pouze stanovení **CK-MB** imunochemicky, není-li k dispozici cTn!
- CK vždy hodnotit s ohledem na svalovou hmotu a fyzickou aktivitu!

- 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

CK

- diagnostika a diferenciální diagnostika muskulopatií, především rhabdomyolýzy a Duchenneovy a Beckerovy muskulární dystrofie
- základní marker poškození především kosterního svalu
- v diagnostice srdečních onemocnění se pro nízkou specifičnost již nepoužívá, nicméně jednou z příčin elevace celkové CK může být i poškození kardiomyocytů
- s nástupem stanovení myoglobinu a troponinu se význam stanovení výrazně snížil a indikační oblastí prakticky zůstává pouze stanovení CK MB při reinfarktu nebo pro retrospektivní posouzení velikosti nekrotického ložiska

CK

Fotometricky

Defosforylace: $\text{KREATIN-P} + \text{ADP} \rightarrow \text{KREATIN} + \text{ATP}$

Hexokinázová reakce: $\text{KREATIN} + \text{GLU} \rightarrow \text{GLU-6-P} + \text{ADP}$

Ox-red (glu-6-PDH): $\text{GLU-6-P} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{6-P glukuronát} + \text{NADPH} + \text{H}^+$

- měří se rychlost nárůstu c NADPH při 340 nm, což odpovídá katalytické koncentraci CK ve vzorku

•

CK

Barevný test (dříve)

Defosforylace: KREATIN-P + ADP → KREATIN + ATP

- je možné stanovit buď uvolněný kreatin, který dává barevnou reakci s diacetylem a α -naftolem
- nebo fosfátový anion uvolněný hydrolyzou kreatin-P, který se deproteinuje a následně stanovuje jako žlutý roztok kyseliny molybdáto-vanadáto-fosforečné
- izoenzymy můžeme stanovit pomocí ELFO, ionexové chromatografie, využitím rozdílů v kinetických vlastnostech, využitím různé aktivace SH skupin a imunochemickými metodami kam patří imunoprecipitace, imunoinhibice a stanovení mass concentration

CK

Enzymová kinetika – imunoinhibice

CK-MM	M	M	+ANTI-M	M	M
CK-MB	M	B		M	B
CK-BB	B	B		B	B

- UV metoda
- stanovení zahrnuje měření CK aktivity za přítomnosti monomeru protilátky CK-M
- tato protilátka kompletně inhibuje aktivitu CK-MM a z poloviny aktivitu CK-MB a zároveň neovlivňuje aktivitu podjednotky B v CK-MB a CK-BB
- užitím CK metody se kvantitativně stanoví CK-B aktivita
- CK-MB aktivita je vypočtena násobením CK-B aktivity dvěma
- Předpoklad: CK-BB v séru nepřítomen (=0)
- Potom: $CK-B \times 2 = CK-MB$

ALP

ALP = alkalická fosfatáza

- katalyzuje degradaci esterů k. fosforečné v alkal. prostředí (pH 8-10)
- 3 izoenzymy – placentárního, střevního (u osob s krevní sk. B a 0) a společného izoenzymu pro játra, kostní tkáň a ledviny (elektroforeticky, rozlišení jaterní a kostní izoformy po vazbě na lektin)
- ostáza: kostní izoenzym ALP - stanovení imunochemické
- jaterní izoenzym - nemoci žlučových cest, hepatopatie
- kostní izoenzym - nemoci kostí (Pagetova choroba, rachitis, nádory, karcinom prostaty, hyperparatyreóza)
- Diagnostika: hepatobiliárních onemocnění a stavů se zvýšeným kostním obratem

ALP

- stanovení celkového ALP je v případě nejasné etiologie patologických hodnot možné doplnit vyšetřením kostní frakce enzymu
- normální aktivita ALP je v normálních granulocytech a blastech
- zvýšená aktivita: gravidita (3 trimestr), stres, infekční nemoci
- zvýšená produkce: aplikace glukokortikoidů, pravá polycytémie, myelofibróza
- snížená až nulová aktivita: chronická myeloidní leukémie paroxysmální noční hemoglobinurie, hypovitamin B₁₂ (snížená aktivita kostního izoenzymu), aktivní hypofosfatémie (AR), hypotyreóza, skorbut, nemoci z ozáření, těžké anemie, léčba imunosupresivy

ALP

Enzym (ALP): $4\text{-NITROFENYL-P} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{-NITROFENOL} + \text{fosforečnan}$

- stanovení aktivity se provádí v tzv. transfosforylačních pufrech
- fosfátová skupina je přenesena na pufr (pH 10,1 - 10,2)
- měří se přírůstek absorbance při 401 až 420 nm, která je dána uvolněným žlutým 4-nitrofenolátem
- reakci lze startovat jak substrátem, tak sérem
- podle typu použitého pufru se mění výsledná aktivita ALP a tím i referenční interval

Metody stanovení:

- N-methyl-D-glucamin (MEG) (v ČR stand.metoda)
- 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP) (IFCC metoda)
- Diethanolamin (DGKC)

ALP

Další metody pro stanovení:

Imunochemicky (kostní izoenzym)

ELFO (izoE jsou separovány dle rozdílnosti nábojů vznikajících glykosylací) – seskupená frakce: jaterní + kostní + placentární

- **Inaktivačně-inhibiční metody** (inaktivace teplem, ureou nebo AA, precipitací specifickým antisérem, využití rozdílné citlivosti k enzymatické desializaci neuraminidázou)
- **Srážení lektinem**
 - lektin pšeničných klíčků (WGA-Wheat Germ Agglutinin) vykazuje silnou afinitu pro část molekuly izoenzymů s navázanou kyselinou sialovou (nejvíce obs. kostní izoE..střevní izoE ji neobsahuje) → komplex
 - ALP v rozpuštěných lyofilizátech je nutné reaktivovat (2 hod při lab. teplotě)

GGT

GGT = gama-glutamyltransferáza, dříve GMT

- katalyzuje přenos γ -glutamylového zbytku z γ -glutamylpeptidů na jiný akceptor (např. peptid nebo AA)
- **játra (žlučové kanálky)**, ledviny (tubul. bb.), pankreas, střevo, prostata...
- vázána na cytoplasmatické membrány
- v krvi dokazatelný enzym je jen jaterního původu
- hepatopatie (zánět, alkohol, léky), test chronické konzumace alkoholu, cholestáza (obstrukce žluč. cest)
- uplatňuje se v procesu regenerace glutationu a ochraně buněk před oxidačním stresem, metabolismu imunomodulátorů, degradaci karcinogenů, alkoholu a xenobiotik (ATB, steroidní hormony)
- vysoká interindividuální variabilita a krátký biologický poločas

GGT

- L- γ -glutamyl-p-nitroanilid (GLU-4-NA)
GLUCANE + glygly \rightarrow GLU-glygly + 5-amino-2-nitrobenzoát (žlutý)
- nebo L- γ -glutamyl-3-karboxy-4-nitroanilid (GLUCANE)
GLU-4-NA + glycylglycin \rightarrow GLU-glygly + p-nitroanilin (barevný)
- měření přírůstku absorbance reakční směsi při 410 nm
- glygly slouží i jako pufr

AMS

AMS = alfa-amyláza, dříve diastáza

- katalyzuje štěpení škrobu na maltózu (trávicí E) - štěpí α -1,4 glykosidické vazby
- slinné žlázy, pankreas (do duodena), plíce, vaječníky, vejcovody, prsní žláza, játra, placenta...
- 2 izoenzymy – slinný (+ slinnému podobný), pankreatický
- pankreatický (akutní pankreatitida – 5-6 hod) a slinný izoenzym (parotitida) jsou z 97% homologní - sérum obsahuje přibližně stejnou jejich katalytickou c

AMS

Patofyziologie:

- při akutní serosní pankreatitidě se zvyšuje permeabilita bazálního pólu acinárních buněk, v případě hemoragicko nekrotizující pankreatitidy navíc dochází k jejich nekróze
- při chronické pankreatitidě (a fibrózních změnách), litiáze, obstrukci tumorem dochází k porušení průtoku pankreat. vývody a zvýšený tlak způsobí rozšíření epiteliálních istmů a průniku pankreatických enzymů do perikapilárních prostor
- diagnostická hodnota vyšetření je pro onemocnění pankreatu nižší v porovnání s lipázou a stanovením pankreatického izoenzymu
- stanovení nemá prognostickou hodnotu, neodráží reziduální funkční kapacitu pankreatu.

AMS

Makroamylazémie

- přítomnost makroamylasového komplexu (glykosylované izoE s Ig a jinými proteiny v séru $M_r = 400\,000$ až $2\,000\,000$)
- plazmatická amyláza s IgA nebo IgG
- komplex brání glomerulární filtraci enzymu a prodlužuje biologický poločas
- prevalence v populaci je asi 0,1 %
- stav je častý u lymfomů, monoklonálních gamapatií a AIDS
- důsledkem snížení renální eliminace je 4x elevace amylázy v séru při normální/snížené aktivitě v moči

AMS

Metody stanovení

Enzym (α -glukozidáza): maltóza + H₂O \rightarrow 2Glu

Metoda IFCC

- S = 4,6-ethyliden(G1)-4-NP(G7)-a-(1[®]4)-D-maltoheptaosid

S + 7Glu + 4-nitrofenol \rightarrow 2-chloro-4-nitrofenyl- α -D-maltotriosid

- působením α -AMS je substrát hydrolyzován na různé oligosacharidy, obsahující buď ethylidenovou skupinu nebo 4-nitrofenol
- oligosacharidy obsahující 4-nitrofenol jsou degradovány pomocným enzymem α -glukozidázou na glukózu a 4-nitrofenol, jehož absorbance se měří při 405 nm
-

LPS

LPS = lipáza

- katalyzuje hydrolytické štěpení tuků (α -sterových vazeb emulgovaných TAG na MAG a MK)
- **pankreas** (do duodena), játra, cévy, tuk, svaly...
- akutní pankreatitida, akutní zvrát (relaps) chronické pankreatitidy, obstrukce pankreat. cest
- izoenzymy: nejvýznamnější pankreatická lipáza (produkována s kolipázou – aktivátor vs. soli žlučových kyselin – inhibitor)
- micelární komplexy „nerozpustný substrát-kolipáza-žlučová kyselina (pH 9)

LPS

Patofyziologický mechanismus uvolnění do cirkulace:

- při akutní serosní pankreatitidě se zvyšuje permeabilita bazálního pólu acinárních buněk, v případě hemoragicko nekrotizující pankreatitidy navíc dochází k jejich nekróze
- při chronické pankreatitidě (a fibrózních změnách), litiáze, obstrukci tumorem dochází k porušení průtoku pankreat. vývody a zvýšený tlak způsobí rozšíření epiteliálních istmů a průniku lipázy do perikapilárních prostor
- zvýšená aktivitu lipázy v séru se nachází u onemocnění pankreatu, zejména u akutní pankreatitidy (aktivita roste obvykle paralelně s AMS), ale existují i případy izolovaného vzestupu aktivity jen jednoho z těchto pankreatických enzymů
- stanovení nemá prognostickou hodnotu, neodráží reziduální funkční kapacitu pankreatu

LPS

Stanovení

Enzym (LPS): TAG a DAG + H₂O → glycerol + 3-,2 MK

- **enzymové štěpení přirozeného substrátu** (titrační stanovení MK)
- **metody imunologické** (ELISA, latex-aglutinační)
 - nejčastěji se používá nefelometrických a turbidimetrických (většina souprav obsahuje i kolipázu)
- **chromogenní test - fotometrický**

LPS

Stanovení

- **chromogenní test - fotometrický**
 - stanovení glycerolu
 - enzymová kaskáda lipázy štěpící 1,2-diacylglycerol, glycerol-kináze, glycerol-3-fosfát oxidáze a peroxidáze s chromogenním produktem.

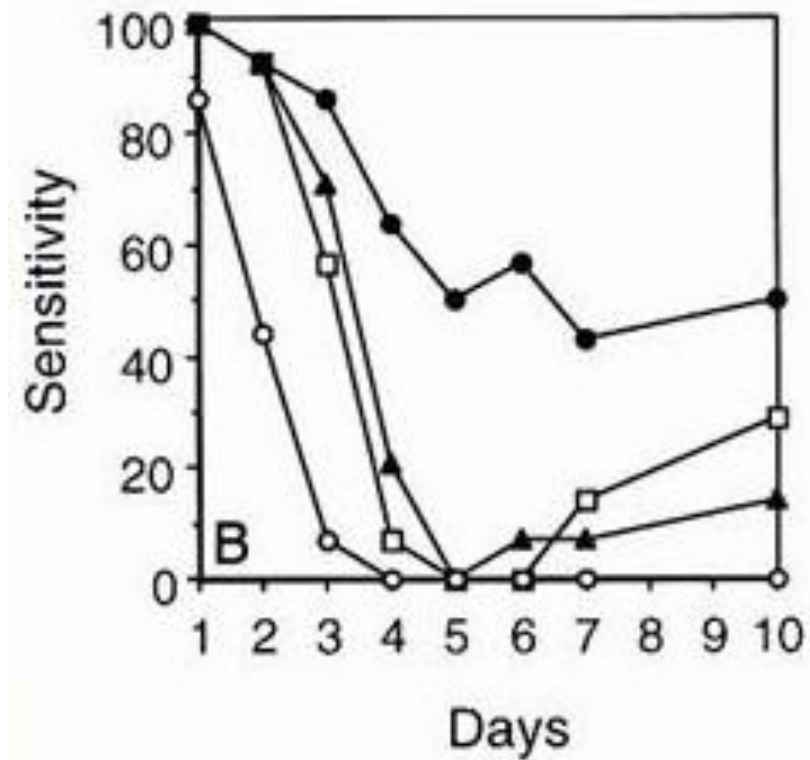


- zcela nový typ techniky stanovení pankreatické lipázy je založen na změně vodivosti roztoku uvolněním mastných kyselin ze substrátu-trioleinu; detekována je akustickým snímačem a měřenou veličinou je frekvenční odpověď.

LPS

Markery akutní pankreatitidy

- ELISA-elastáza
- Lipáza
- △ Amyláza
- RIA-elastáza



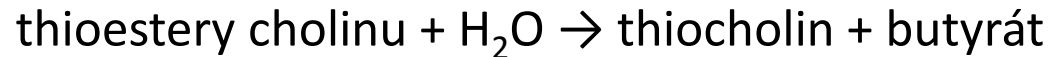
CHE

- **CHE** = cholinesteráza
(správněji acylcholinacylhydroláza, pseudocholinesteráza)
- katalyzuje degradaci esterů cholinu a jeho esterů (aryl-, alkyl-esterů, butyrylthiocholinu)
- **v ribosomech jater** (sekrece játry, aktivita v mozku, nervových bb., svalech...)
- snížená aktivita: poruchy proteosyntézy - chronické hepatopatie a hladovění, alkoholicko-toxická hepatitida (intoxikace organofosfáty – nekompetitivní inhibitory)
- vícero alel genu pro CHE - různé fenotypové varianty enzymu mají rozdílnou afinitu a schopnost degradace cholinu
- praktický význam při aplikaci sukcinylcholinu v rámci anestézie, v případě nepřítomnosti funkční CHE se působení sukcinylcholinu na nervosvalové ploténce prodlužuje a apnoe může trvat mnohem déle (hrozí i hyperkalémie a srdeční arytmie)

CHE

Stanovení

- S: thioester cholinu (butyrylthiocholinjodid nebo méně často acetylthiocholinjodid)



- chromogenní reakce s činidlem dle Ellmanové (DNTB = kyselina 5,5'-dithio-bis-nitrobenzoová) nebo 4,4'-dithiodipyrídinem.
thiocholin + DTNB \rightarrow 5-merkaptó-2-nitrobenzoová kyselina (žlutá)
- měří se nárůst absorpance mezi 30. a 90. sekundou při 405 - 410 nm
- analýza se provádí ve fosfátovém pufru o pH 7,7, reakce se startuje S
- CHS může být stanovena také imunochemickými metodami.

Enzymy v moči

NAG = N-acetyl-beta-glukosaminidáza

- v moči se využívá například pro časnou detekci nefropatie (tublopatie) při DM, pro sledování nefrotoxických účinků léků (cisplatina, těžké kovy, aminoglykosidy), pro odhalování rejekce ledviny po transplantaci
- u diabetu předchází pozitivita NAG pozitivitu mikroalbuminurie.
- stanovuje se jako poměr ke kreatininu v moči, horní referenční mez 0,004 $\mu\text{kat}/\text{mmol}$ kreatininu (tj. 0,25 U/mmol kreatininu)
- U_NAG/U_kreatinin
- fluorometricky, kolorimetricky, spektrofotometricky a pomocí testáčnických proužků

GGT

- při lézi tubulárních buněk ledvin se může GGT objevit i v moči

Enzymy

Preanalytika při stanovení enzymů

- odběr srážlivé (případně nesrážlivé – heparinát Li) krve ráno nalačno, před odběrem nepít alkohol (**ALT**, AST, GGT, AMS, LPS, CHS), bez fyzické námahy (**CK**, **AST**, LD), vynechat léky (je-li to možné), při odběru co nejkratší stažení paže (CK, AST, LD)
- při odběru krve na vyšetření **AMS** vyloučit kontaminaci slinami či potem
- dodržovat zásady odběru a vyhnout se **hemolýze** (LD, ACP, **AST**, ALT, CK, AMS ...) – před vpichem nechat zaschnout dezinf. prostředek, nevystříkovat krev do zkumavky přes jehlu nebo příliš prudce, krev neskladovat v chladničce, v blízkosti topení, na slunci, dodržovat poměr antikoagulačního činidla a krve...

Enzymy

Změna referenčních hodnot

- **dle pohlaví:**

- muži - ↑ **CK, GGT** (produkce v prostatě), **ACP**
- ženy - ↓ **CHS** (před menopauzou, více při užívání p.o. antikoncepce)

- **dle věku:**

- děti - ↑ **ALP, ACP**, ↓ **CK**
- novo, koj. + ↑ **ALT, AST, GGT, LD** (novo + ↑ **CK**)

- **těhotenství:**

- ↓ **CHS, CK, GGT**, ↑ **ALP** a **AMS** (nepankreatická) – 2. a **3.** trimestr

Kazuistika

Jaterní poškození

- **mírné**
 - ↑ permeabilita membrán: cytoplazmatické enzymy
 - ALT → množství postižených bb., již při postižení 2 % jater
 - ASTc (30 %)
 - LD5 → všudypřítomná, obsolentní vyšetření pro dg. hepatopatií!
- **těžké: nekróza: mitochondriální enzymy**
 - ASTm (70 %)
 - De Ritisův kvocient AST/ALT
 - → prognostický ukazatel, tíže onemocnění + zohlednit čas /doba od vzniku – $t_{1/2}$
 - rozdíly $t_{1/2}$ aminotransferáz → ALT téměř 2x delší než AST

Kazuistika

Jaterní poškození

- **těžké: nekróza: mitochondriální enzymy**
- AST/ALT > 0,7 (1,0): nekróza
- vyloučit jiný orgánový původ AST – kosterní sval, myokard, ery, ledviny...
- extrémní hodnoty aminotransferáz (\uparrow 10 – 100 x): a. virová hepatitis, toxické poškození jater (paracetamol, muchomůrka zelená, organická rozpouštědla), hypoxie (šok), pravostranné srdeční selhání (městnání)
- \downarrow CHS (pseudo)

Kazuistika

Jaterní poškození

- prognostický ukazatel funkce jater – počet fungujících bb. (enzym syntetizující se v játrech)
- → nepříznivé znamení: náhlý, výrazný pokles aktivity enzymu
- $c < 40$ ukat/l, akutní toxické poškození < 10 ukat/l

- jiné příčiny:
 - otrava insekticidy (organofosfáty) < 30 ukat/l (inhibice aktivity !)
 - dědičný nedostatek - vyšetřit vždy před celkovou anestezií: nebezpečí podání (dlouhé „probouzení“ po narkóze)

Kazuistika

Cholestáza

- → po určité době přidružení hepatocelulárního postižení

enzymy bun. membrány žlučvodů:

- GGT - rovněž ↑ syntéza (mikrosomální indukce): léky, toxické látky, regenerace, nádor
- 10x ↑ při obstrukci a toxickém poškození
- ALP - při hepatopatii jaterní i střevní izoE (↓ inaktivace)
- 3-5x ↑ při obstrukci
- děti: Odysseův sy. (idiopatická přechodná hyperfosfatazémie) → týdny až měsíce
- 10 – 20 x ↑ ALP (atypická pohyblivost v ELFO)