

2_2 ENZYMY V KLINICKÉ DIAGNOSTICE

Druhy enzymů v plasmě:

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

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

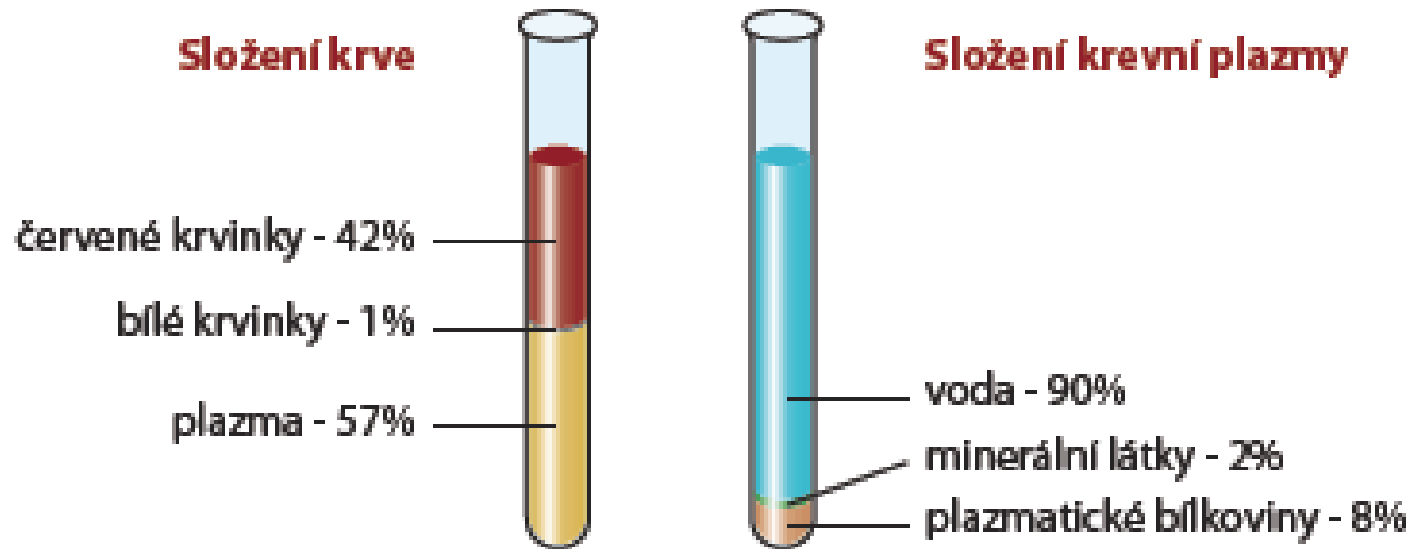
X v buňce asi 10^3 - 10^4 x vyšší

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

STANOVENÍ ENZYMŮ V DIAGNOSTICE

- KREVNÍ SÉRUM
- PLASMA
- MOZKOMÍŠNÍ MOK, MOČ A DALŠÍ

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.

ENZYMY V KLINICKÉ DIAGNOSTICE

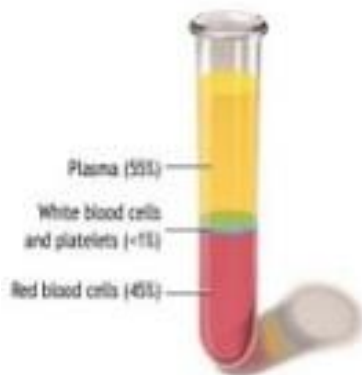
2. Plasma vs. serum

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

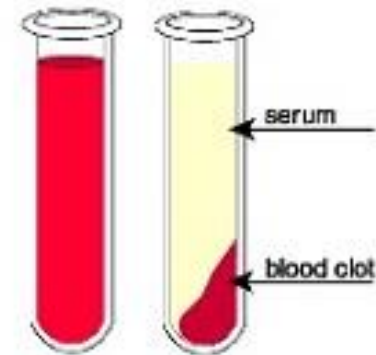
Anticoagulated

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

Clotted



• serum = plasma - fibrinogen



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 → plasmu

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.

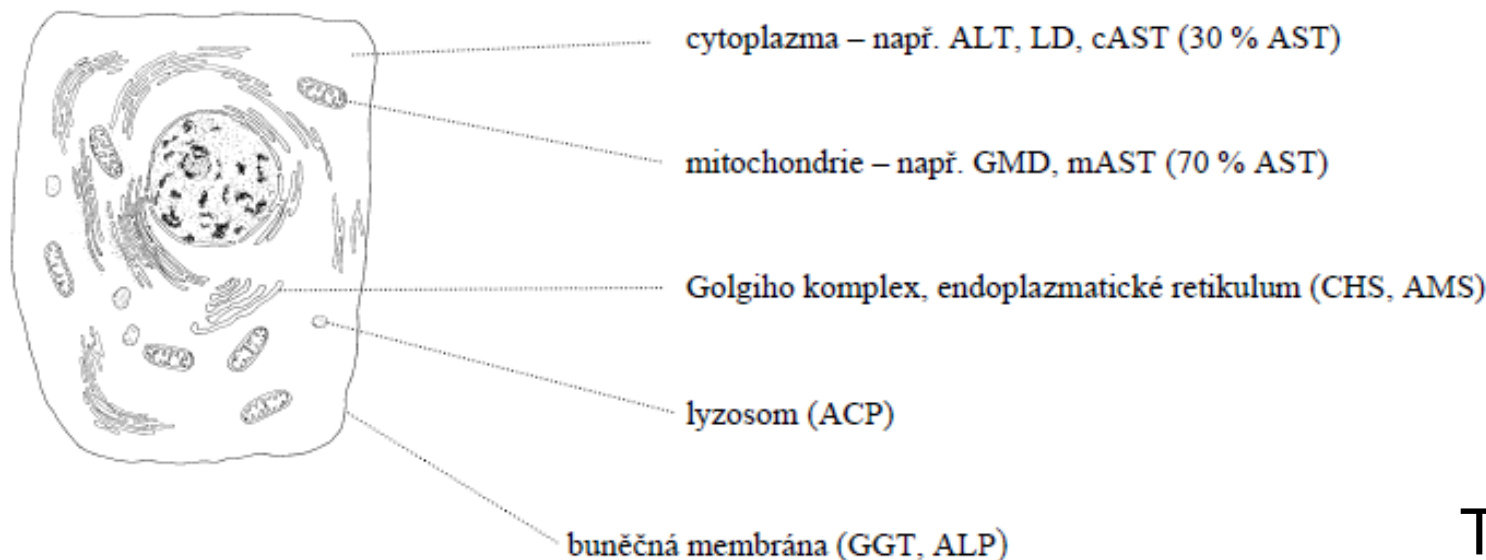
Biologický poločas enzymu – doba, za kterou by množství enzymu kleslo na polovinu, pokud by nebyl enzym ze tkání doplněn

<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.

Využití enzymů v klinické diagnostice

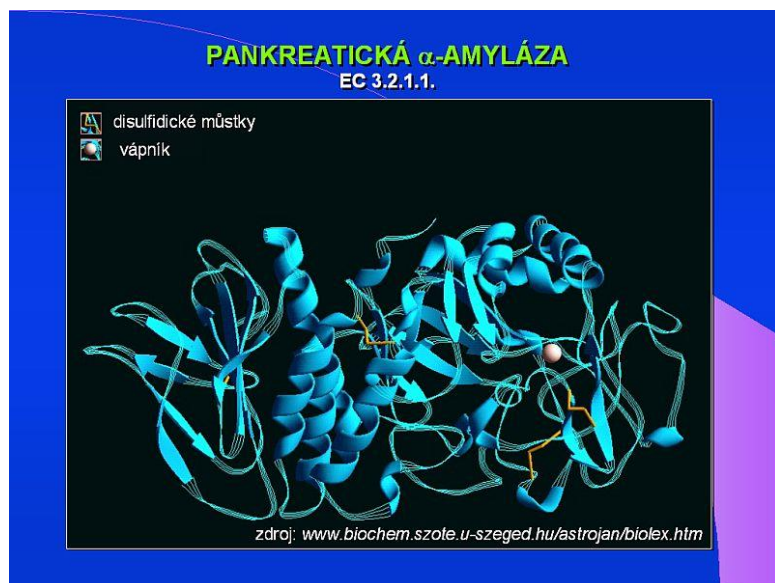
- **Detekce poškození tkáně**
- **Identifikace počátku poškození tkáně**
- **Stanovení rozsahu poškození**
- **Odhad závažnosti poškození buněk**
- **Diagnóza základních onemocnění**
- **Specifikace diagnózy v rámci poškozeného orgánu**

Upřesnění diagnózy

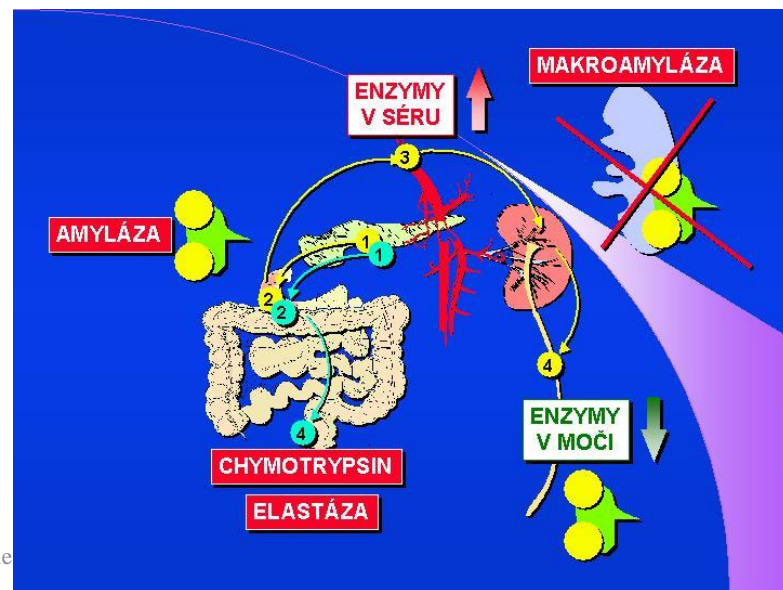
- Informace vhodná pro upřesnění diagnózy se získá:
 - - z hodnoty **katalytické koncentrace enzymu v tělní tekutině** (přímá úměra mezi stupněm poškození orgánu a zvýšenou aktivitou enzymy v krvi).
 - - s přítomného **spektra enzymů v krvi** (např. při **těžkém poškození jaterního parenchymu** doprovázeném 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 icterus ($AST/ALT < 1$) 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 provázena i zvýšením amylasy v moči.

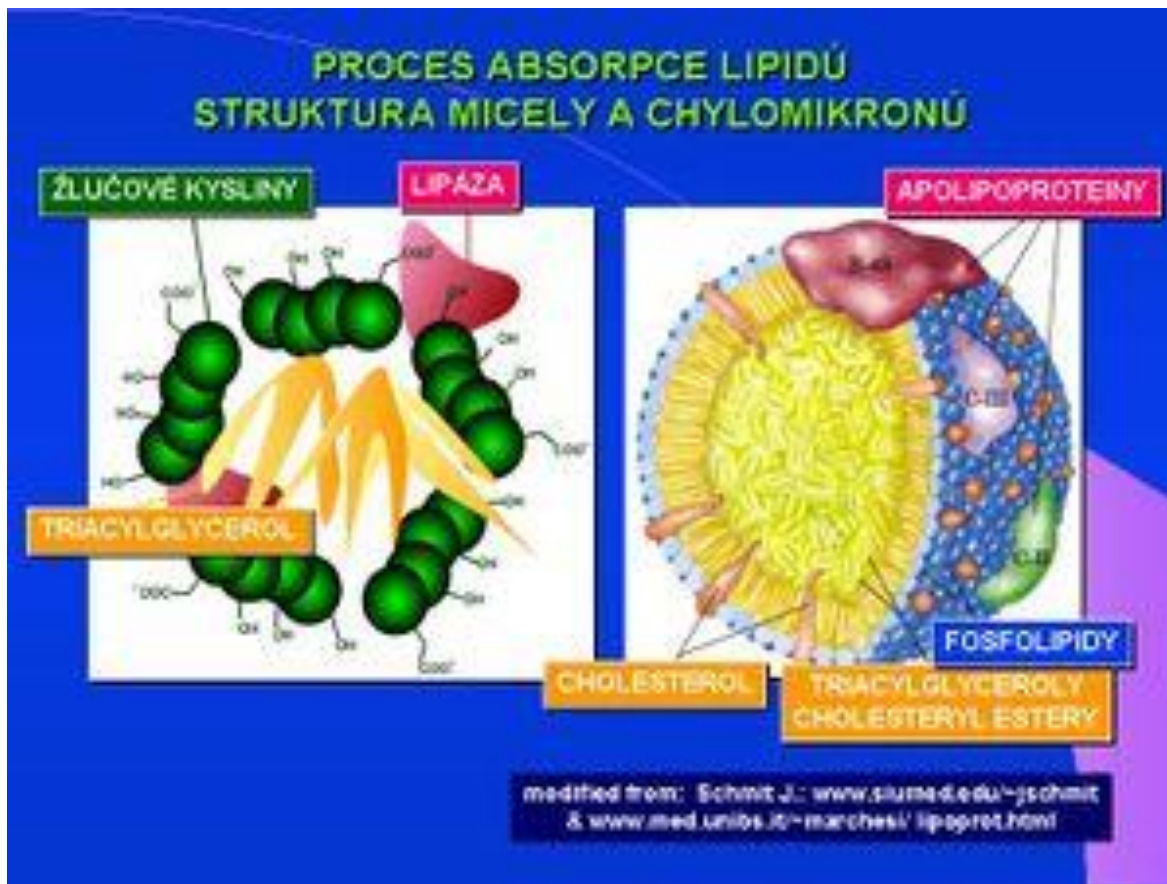


y_v_diagnosticePatobiochemie



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 ₁	CK	GGT ⁺	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

Aminotransferasy

- zajišťují konverzi aminokyselin a α -ketokyselin přenosem aminoskupiny, donor a akceptor aminoskupiny je 2-oxoglutarát/ L-glutamát
- Alaninaminotransferasa, ALT – donorem NH_2 Ala za vzniku pyruvátu, marker- játra (virová hepatitida, alkohol, hepatopatie ...)
- Aspartátaminotransferasa, AST – donorem 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

α -amylasa, AMS

- syntetizována ve slinivce, štěpí α -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⁺ ↔ pyruvát + NADH + H⁺ (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* (*Mr* ~ 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**