

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO–TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

GLUTAMÁTDEHYDROGENÁZA – MARKER HEPATOTOXICITY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Martina Víšová

VEDOUCÍ PRÁCE: RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

2012

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

**GLUTAMATE DEHYDROGENASE -
A HEPATOTOXICITY MARKER**

THESIS

AUTHOR: Bc. Martina Víšová

SUPERVISOR: RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, za odborného vedení RNDr. Tomáše Roušara, Ph.D. Všechny podklady, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla dle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na náhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 3. 5. 2012

Martina Víšová

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martina Víšová**
Osobní číslo: **C10908**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Glutamátdehydrogenasa - marker hepatotoxicity**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1.) Zpracujte literární rešerši zaměřenou na podrobný popis funkcí glutamátdehydrogenasy, její lokalizaci v buňce a význam. Dále se zaměřte na možnosti stanovení tohoto enzymu a jeho význam při charakterizaci hepatotoxicity. Uveďte také přehled dalších možných enzymových markerů hepatotoxicity in vivo. Ke zpracování tohoto přehledu využijte elektronické databáze (ScienceDirect, NCBI Pubmed, HighWire).
- 2.) Na základě získaných poznatků zaveďte a otestujte vliv různých parametrů metodiky na stanovení aktivity glutamátdehydrogenasy (druh pufru - fosfátový vs. triethanolaminový, pH, tepelná stabilita). Pro optimalizaci stanovení enzymové aktivity využijte purifikovaný enzym.
- 3.) Optimalizovanou metodu využijte při stanovení aktivity glutamátdehydrogenasy v séru potkanů kmene Wistar, popř. ICR myši. Ke zjištění specifické aktivity využijte stanovení proteinů dle Bradforda.
- 4.) Získaná experimentální data podrobně zpracujte, určete optimální podmínky stanovení glutamátdehydrogenasy a navrhňte experimentální protokol. Porovnejte výsledky s výstupy jiných autorů. Vyhodnoťte možné užití glutamátdehydrogenasy jako markeru hepatotoxicity.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce:

3. října 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

4. května 2012



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Na tomto místě bych chtěla zejména poděkovat vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. za odborné vedení, připomínky a konzultace během zpracování této diplomové práce.

Dále mé poděkování patří Mgr. Erice Nýdlové za pomoc a cenné rady. V neposlední řadě chci poděkovat prof. MUDr. Zuzaně Červinkové CSc. a MUDr. Ottu Kučerovi, Ph.D. za poskytnutí biologických vzorků.

Také bych velmi ráda poděkovala celé rodině a mému příteli za podporu a trpělivost během celého studia.

Souhrn

Glutamátdehydrogenáza (GLDH) je enzym patřící do třídy oxidoreduktáz. Uplatnění nachází při metabolismu dusíku, kde katalyzuje oxidační deaminaci glutamátu a také hraje důležitou roli v udržení energetické homeostázy. Glutamátdehydrogenáza je složená ze šesti stejných podjednotek a vyskytuje se ve formě 2 izoenzymů. Aktivita enzymu výrazně stoupá v krvi při nekróze jaterních buněk. Nejčastější metodou stanovení glutamátdehydrogenázy je spektrofotometrie, kdy je detekován pokles absorbance způsobený oxidací NADH při 340 nm. Tento pokles je přímo úměrný aktivitě glutamátdehydrogenázy ve vzorku. Cílem naší práce bylo optimalizovat metodu stanovení aktivity glutamátdehydrogenázy a zjistit, za jakých podmínek je tento enzym stabilní. Naším druhým cílem bylo potvrzení důležitosti glutamátdehydrogenázy jako markeru toxického poškození jater.

Testovali jsme vliv různých koncentrací NADH a α -ketoglutarátu jako substrátů na aktivitu GLDH. Určili jsme, že pro stanovení aktivity GLDH je optimální koncentrace 0,2 mM NADH a 13 mM α -ketoglutarát. Jako optimální pufr jsme vyhodnotili draselno-fosfátový pufr (pH 7,5). Poté jsme stanovili optimální podmínky skladování. Standardy GLDH jsme uchovávali při pokojové teplotě 23 °C, v lednici při 4 °C a také jsme enzym skladovali zmražený při -20 °C a -80 °C. Z výsledků vyplývá, že dostatečně stabilní byl enzym skladovaný při -80 °C, avšak pro běžné použití je vhodnější připravovat enzym vždy čerstvý. V rámci další práce jsme sledovali změnu aktivity GLDH ve vzorcích sér potkanů, kteří byli vystaveni účinku acetaminofenu a zároveň u nich byla také provedena parciální hepatektomie jater. Naměřené výsledky jsme porovnávali s aktivitami ostatních enzymů používaných při diagnóze akutního poškození jater (ALT, AST, ALP). Porovnáním aktivit jsme zjistili, že k nejvýraznějšímu vzestupu došlo u GLDH - v porovnání s kontrolními vzorky se sérová aktivita GLDH zvýšila 22x na rozdíl od aktivit ALT, AST a ALP, kde nebyl vzestup aktivit tak znatelný. Aktivita GLDH navíc s ostatními enzymovými markery toxického poškození jater vykazovala velmi vysokou korelaci. Na základě získaných poznatků jsme zavedli metodu stanovení aktivity glutamátdehydrogenázy a vyhodnotili jsme její použití jako vhodného markeru hepatotoxicity.

Klíčová slova: glutamátdehydrogenáza, markery jaterního postižení, játra, acetaminofen.

Summary

Glutamate dehydrogenase (GLDH) belongs to the oxidoreductase class of enzymes. It catalyzes oxidative deamination of glutamate and also plays an important role in maintenance of energy homeostasis. Glutamate dehydrogenase composes of six identical subunits and occurs as two isoenzymes. The enzyme activity in blood rises during necrosis of liver cells thus it has been used as a marker of hepatotoxicity. The most frequent method for GLDH-assay is spectrophotometry which detects decrease of absorbance caused by oxidation of NADH at 340 nm. The signal is directly related to the activity of glutamate dehydrogenase in sample. The aim of our study was to optimize the method for determination of glutamate dehydrogenase activity, and to find out the optimal conditions for enzyme stability. Another aim was to confirm the importance of GLDH as a marker of toxic liver damage.

We tested the effect of concentrations of NADH and 2-oxoglutarate as substrates of GLDH. We found that 0.2 mM NADH and 13 mM 2-oxoglutarate are optimal in the assay. We established the potassium phosphate buffer (pH 7.5) as suitable buffer. Then, we determined optimal storage conditions. We kept GLDH standards at room temperature (23 °C) and at 4 °C and we also stored the enzyme at -20 °C and -80 °C. The results showed that the enzyme stored at -80 °C was adequately stable, but it is better to prepare a fresh enzyme if possible. Furthermore, we monitored the changes of GLDH activity in serum of rats exposed to toxic effect of acetaminophen and partial hepatectomy. Measured results were compared with activities of other enzymes used to determine acute liver damage - ALT, AST, ALP. We found out 22-fold increase of GLDH activity in comparison with control samples; the increase of activities of ALT, AST and ALP was not so apparent. Moreover, GLDH activity showed high correlation with other enzymatic markers of toxic liver damage. Based on our findings, we established a method for glutamate dehydrogenase activity assay and we evaluated its application as a suitable marker of hepatotoxicity.

Key words: glutamate dehydrogenase, liver injury markers, liver, acetaminophen.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADP	adenozindifosfát
ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
APAP	acetaminofen
Arg	arginin
AST	aspartátaminotransferáza
ATP	adenozintrifosfát
DV	deionizovaná voda
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
GDP	guanozindifosfát
GGT	gama-glutamyltransferáza
GLDH	glutamátdehydrogenáza
GLDH-1	termostabilní glutamátdehydrogenáza
GLDH-2	termolabilní glutamátdehydrogenáza
Gly	glycin
GTP	guanozintrifosfát
α -KG	α -ketoglutarát
K _m	Michaelisova konstanta
KP	draselno-fosfátový pufr
LD	laktátdehydrogenáza
NAD	oxidovaný nikotinamidadeninukleotid
NADH	redukováný nikotinamidadeninukleotid

NADP	oxidovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
PB	sodno-fosfátový pufr
NAPQI	N-acetyl-p-benzochinonimin
TEA	triethanolaminový pufr
TAA	thioacetamid

OBSAH

1. Úvod.....	14
2. Teoretická část	15
2.1 Játra	15
2.1.1 Játra a jejich funkce	15
2.1.2 Anatomie jater.....	15
2.1.2.1 Jaterní buňky - hepatocyty	16
2.1.2.2 Hepatocyty a jejich toxické poškození	16
2.1.2.3 Další jaterní buňky.....	17
2.2 Toxiny	18
2.2.1 Hepatotoxické působení látek.....	18
2.2.2 Popis účinku vybraných hepatotoxinů	19
2.2.2.1 Toxické působení acetaminofenu na jaterní tkáň	19
2.2.2.2 Toxické působení thioacetamidu na jaterní tkáň	21
2.3 Enzymové markery toxického poškození jater (<i>in vivo</i>).....	23
2.3.1 Aspartátaminotransferáza	23
2.3.2 Alaninaminotransferáza.....	24
2.3.3 Gama-glutamyltransferáza.....	25
2.3.4 Alkalická fosfatáza	25
2.3.5 Glutamátdehydrogenáza	26
2.4 Glutamátdehydrogenáza.....	27
2.4.1 Funkce glutamátdehydrogenázy	27
2.4.2 Struktura glutamátdehydrogenázy	28
2.4.3 Glutamátdehydrogenáza a její izoenzymy	30
2.4.4 Glutamátdehydrogenáza z drsného endoplazmatického retikula.....	31
2.4.5 Možnosti transportu glutamátu do mitochondrií.....	31
2.4.6 Stanovení aktivity enzymu glutamátdehydrogenázy.....	32

2.4.7	Defekt glutamátdehydrogenázy	32
2.5	Porovnání enzymových markerů hepatotoxicity	34
3.	Cíl práce	36
4.	Experimentální část	37
4.1	Seznam použitých chemikálií	37
4.2	Příprava roztoků.....	38
4.3	Přístroje a laboratorní vybavení	40
4.4	Podmínky stanovení aktivity glutamátdehydrogenázy	41
4.5	Stanovení aktivity glutamátdehydrogenázy.....	42
4.5.1	Optimalizace koncentrace NADH.....	42
4.5.2	Optimalizace koncentrace α -ketoglutarátu	43
4.5.3	Optimalizace pH.....	44
4.5.4	Testování stability glutamátdehydrogenázy	44
4.5.4.1	Testování teplotní stability glutamátdehydrogenázy	44
4.5.4.2	Testování stability glutamátdehydrogenázy při skladování	45
4.5.5	Stanovení aktivity enzymových markerů v séru potkanů.....	45
4.5.5.1	Stanovení aktivity GLDH ve vzorcích sér potkanů	46
4.5.5.2	Stanovení aktivity ALT, AST, ALP ve vzorcích sér potkanů.....	46
5.	Výsledky	47
5.1	Optimalizace koncentrace NADH	47
5.2	Optimalizace koncentrace α -ketoglutarátu.....	48
5.3	Optimalizace pH	50
5.4	Testování stability glutamátdehydrogenázy	51
5.4.1	Testování teplotní stability glutamátdehydrogenázy.....	51
5.4.2	Testování stability glutamátdehydrogenázy při skladování	52
5.5	Stanovení aktivity glutamátdehydrogenázy v biologickém materiálu	53
5.5.1	Stanovení aktivity GLDH ve vzorcích sér potkanů	53

6.	Diskuze	57
7.	Závěr	62
8.	Seznam literatury	63
9.	Přílohy	70

1. Úvod

Játra hrají centrální úlohu v celé řadě životně důležitých funkcí. Jejich poškození ovlivňuje téměř všechny metabolické procesy v organismu. Porucha jater (mechanická, působením toxinů či jiná) je rozsáhlý problém, jenž může končit i smrtí. Z tohoto důvodu patří laboratorní testování jaterních funkcí k základním vyšetřovacím postupům. Toto vyšetření zahrnuje i biochemické stanovení enzymových markerů toxického poškození jaterní tkáně. K nejvýznamnějším markerům patří glutamátdehydrogenáza, alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza, gama-glutamyltransferáza a další. Smyslem stanovení enzymových markerů je rychlejší a snadnější rozpoznání druhu jaterního onemocnění, rozsáhlosti postižení a zároveň zabránění dalšímu rozvoji či šíření poškození při včasné diagnóze. Vyřknutí diagnózy ale nemůže být pouze na základě hodnot enzymových markerů, vždy musí být v kontextu s dalšími vyšetřeními a klinickými příznaky daného pacienta.

Určení aktivity enzymu glutamátdehydrogenázy přináší několik výhod. Glutamátdehydrogenáza je enzym, jehož aktivita v séru rychle stoupá po poškození jaterní tkáně vlivem toxického působení látek, které vede k nekróze buněk. Tento enzym má vysokou specifitu a senzitivitu. Nejvíce je lokalizován právě v mitochondriích hepatocytů. Při těžkém porušení parenchymu dochází k uvolnění enzymu do krevního oběhu. Jeho nástup lze zachytit dříve oproti dalším enzymovým markerům téhož druhu. Navíc stanovení těchto enzymů je jednoduché, cenově přijatelné a snadno interpretovatelné.

2. Teoretická část

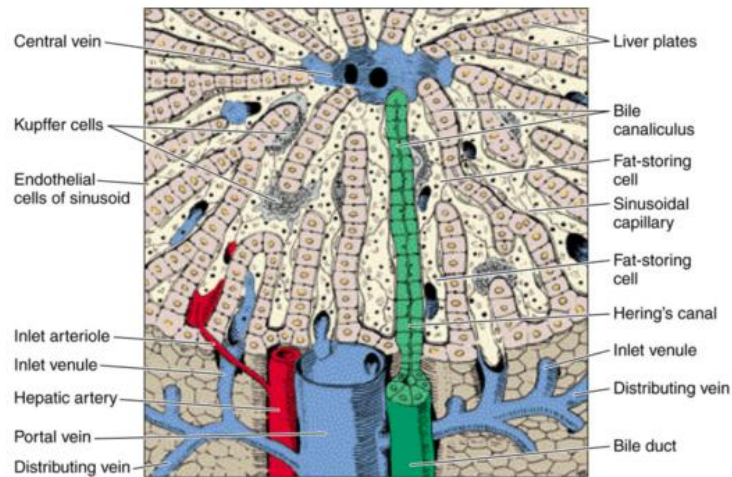
2.1 Játra

2.1.1 Játra a jejich funkce

Játra jsou největší a nejtěžší žlázou lidského těla. Mají velmi bohaté cévní řečiště, kterým protéká v průměru 1,5 litru krve za minutu. Játra hrají centrální úlohu v celé řadě životně důležitých pochodů. V játrech dochází k metabolismu sacharidů, lipidů a lipoproteinů, k syntéze glykogenu, plazmatických a sérových bílkovin. Játra secernují žluč a odstraňují metabolicky změněné molekuly proteinů. Vedle metabolických funkcí se účastní fetální krvetvorby a mnoha dalších různě důležitých dějů. Játra hrají zásadní roli i v homeostáze organismu, dochází v nich k detoxikaci amonného iontu, buď prostřednictvím ureageneze, nebo v procesu glutaminogeneze. Neméně důležitá je detoxikační a biodegradační funkce jak látek endogenních, tak i xenogenních, jako jsou např. toxické látky, léky a jejich metabolity (Čihák, 2002; Racek et al., 2006).

2.1.2 Anatomie jater

Jaterním parenchymem se označuje tkáň, která je tvořena jaterními buňkami. Základní funkční jednotkou jaterní tkáně je jaterní lalůček. Tvoří ho jaterní buňky, hepatocyty. Dvě k sobě přiložené řady jaterních buněk vytvářejí jaterní trámce. Mezi těmito trámci jsou cévy. Jaterní trámce jsou spolu s cévami uspořádané v útvaru, zvaný lalůček centrální žíly, jenž tvoří základní morfologickou jednotku jater. Centrální žíla probíhá v ose lalůčku a přijímá ze všech stran krev jaterními sinusoidy. Sinusoidy jsou tenkostěnné žilní útvary charakteru kapilár (obr. 1). Kolem těchto kapilár jsou ve dvojitých řadách hepatocyty, které vytvářejí již zmíněné trámce. Prostor, který je mezi endotelem sinusoidů a hepatocyty, se nazývá Disseho prostor. Při průtoku krve játry se uplatňují dvě hlavní složky: složka funkční a složka nutritivní. Do složky funkční patří *vena portae*, která přivádí do jater krev bohatou na látky vstřebané z potravy ve střevě, jež jsou zpracovány později v játrech. Složku nutritivní tvoří *arteria hepatica propria*, vedoucí krev obohacenou kyslíkem (Čihák, 2002).



Obr. 1: Jaterní lobulus (Junqueira et Carneiro, 2009)

2.1.2.1 Jaterní buňky - hepatocyty

Hepatocyty mají průměr okolo 20 - 30 μm a jejich povrch je pokryt mikrokilky, na které jsou vázány některé enzymy. Na styku dvou hepatocytů se nachází žlučový kanálek. Hepatocyty mohou být velmi často dvojjaderné, vyskytují se ale i hepatocyty s velkými jádry a polyploidním počtem chromozomů. Vzhledem k vysoké metabolické aktivitě těchto jaterních buněk obsahují velké množství organel. Nalezneme v nich mitochondrie, rozsáhlý Golgiho komplex, bohaté granulární i agranulární endoplazmatické retikulum, četné lysozomy a inkluze.

2.1.2.2 Hepatocyty a jejich toxické poškození

Podle toho, kde jsou hepatocyty uloženy v jaterním lalůčku je složení, enzymové vybavení a funkce jaterních buněk značně odlišná. Hepatocyty, které jsou uloženy v blízkosti periportální oblasti, jsou dobře zásobeny kyslíkem a obsahují vysokou aktivitu aminotransferáz: alaninaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotransferázy (AST), laktátdehydrogenázy (LD), gama-glutamyltransferázy (GGT) a alkalické fosfatázy (ALP). Naopak hepatocyty umístěné v centru lalůčku jsou zásobeny kyslíkem podstatně méně, obsahují vysokou aktivitu glutamátdehydrogenázy (GLDH) a jsou mnohem více citlivé na toxické působení látek (Racek et al., 2006).

Při poškození hepatocytů dochází k vyplavování jejich nitrobuněčného obsahu, zejména enzymů, ale i jiných neenzymových složek. Poté aktivita enzymů v séru rychle roste. Poškození hepatocytů může být dvojího typu - mírné a těžké. Mírné poškození se projevuje zvýšenou permeabilitou buněčné membrány a v krvi nalezneme vyšší aktivitu

cytoplazmatických enzymů - ALT, LD a AST. U těžkého poškození dochází k nekróze buněk a tím se do krve uvolňují i enzymy, které jsou lokalizované intramitochondriálně, v séru stoupá aktivita AST, poměr AST/ALT je vyšší než 1 a výrazně stoupá aktivita GLDH (Racek et al., 2006; Ozer et al., 2008).

2.1.2.3 Další jaterní buňky

Mezi jaterní buňky patří kromě hepatocytů i Kupfferovy buňky. Svou funkci plní v imunitních procesech a ve vylučování cizorodých antigenů. Dalším typem jaterních buněk jsou buňky perisinusoidální (Itovy buňky), buňky cévních stěn, vaziva a žlučových. Perisinusoidální jaterní buňky mají důležitou funkci v organizaci jaterních trámců při regeneraci po toxickém poškození, produkují růstový faktor a ve svých tukových kapénkách obsahují vitamin A.

2.2 Toxiny

2.2.1 Hepatotoxické působení látek

Jak již bylo řečeno, játra mají nespočetně funkcí. Mezi ně patří metabolismus většiny endogenních a exogenních látek a to je i jedna z příčin jejich toxického poškození. Játra jsou pro život nepostradatelná a jakékoliv jejich poškození může vést k problémům, i ke smrti (Kučera et al., 2006). K toxickému poškození jater může dojít z požití toxických látek. Jaterní poškození mohou způsobovat chemické látky nebo přírodní toxiny, které se vyskytují všude okolo nás, ale také znečištěné životní prostředí. Poškození jater mohou způsobovat i nežádoucí účinky některých léků (tab. I). Toxické poškození jater můžeme rozdělit na akutní a chronickou formu. Akutní poškození může být cytotoxické, cholestatické nebo smíšené. Cytotoxické poškození je charakterizováno nekrózami, steatózou či obojím. Mezi chronická poškození jater patří chronické hepatitidy, steatózy, fosfolipidózy, několik forem cirhózy, nádory jater a další (Chang et Schiano, 2007). Pro sledování účinků toxických látek se používají nejrůznější modelové systémy. Mezi nejčastěji používané modely patří izolovaná perfundovaná játra, jaterní řezy, izolované jaterní buňky, subcelulární frakce (mikrozomální frakce hepatocytů a izolované mitochondrie), buněčné linie a další (Kučera et al., 2006).

Tab. I: Přehled látek, které mohou způsobit toxické poškození jater

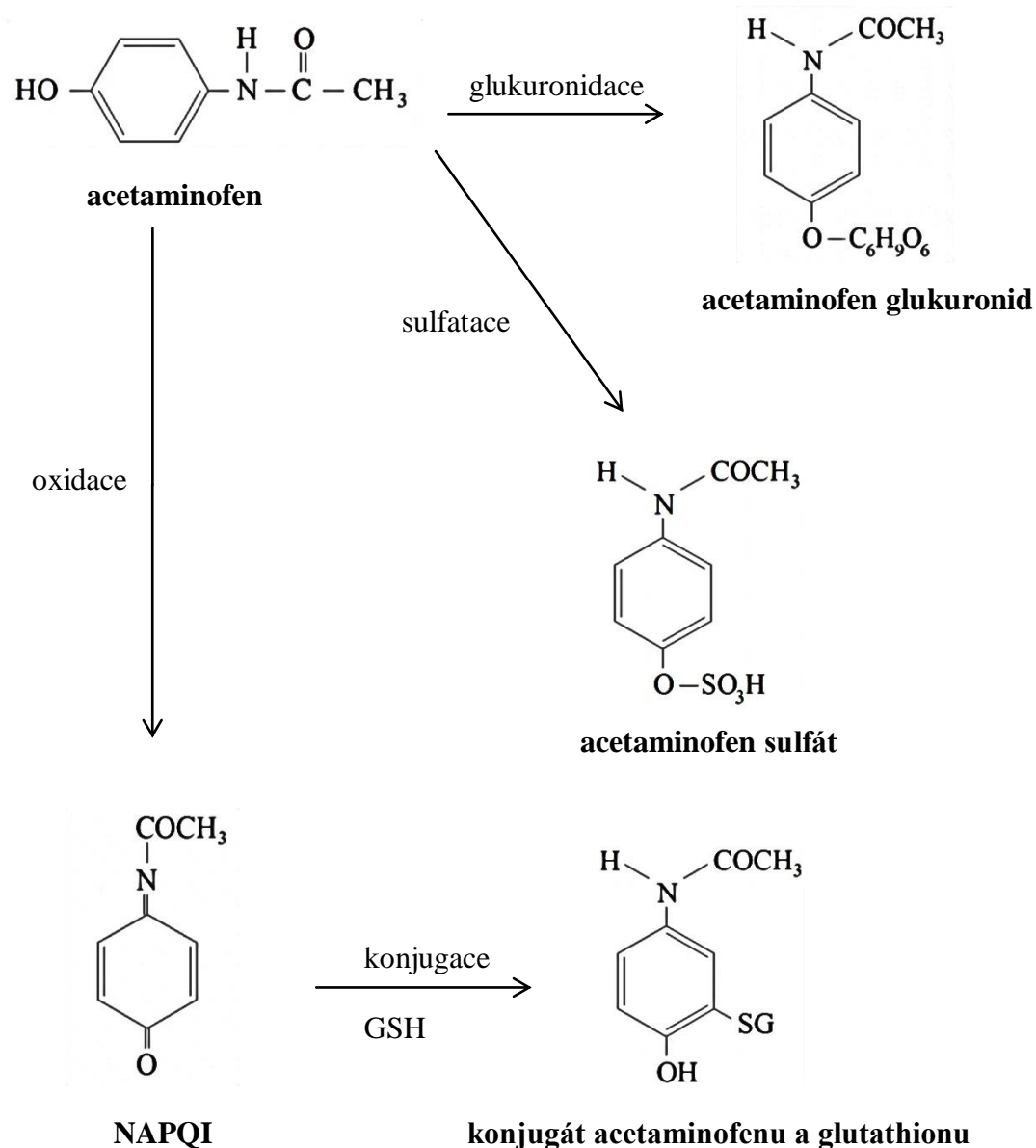
Skupiny toxinů	Příklad hepatotoxinů
Léčiva	Acetaminofen, kortikosteroidy, některá antibiotika
Alkohol	Ethanol
Toxiny sinic	Microviridin, microcystin, nodularin
Mykotoxiny	Aflatoxin, cyclochlorotin, luteoskyrin
Jedy vyšších hub	Amanitin, falloidin
Chemické látky	Tetrachlormethan, thioacetamid, organofosfáty
Toxické prvky	Kadmium, rtuť, měď, olovo, fosfor

2.2.2 Popis účinku vybraných hepatotoxinů

2.2.2.1 Toxické působení acetaminofenu na jaterní tkáň

Acetaminofen je používán jako efektivní analgetikum a antipyretikum (Halmes et al., 1996). Jeho antipyretické účinky jsou vysvětlovány inhibicí cyklooxygenázy v hypothalamu. Analgetický účinek spočívá v nepřímém působení na serotoninové 5-HT₃-receptory v míše (Lincová et al., 2005). Acetaminofen se velice často používá jako modelový toxin pro studium hepatotoxicity (Jaeschke et Bajt, 2006). Patří mezi xenobiotika, která jsou detoxikována pomocí glutathionu. Je toxický pouze při předávkování a u nemocných s deplecí glutathionu (Perlík, 2008). Po běžných terapeutických dávkách je výskyt nežádoucích účinků malý, někdy se objeví alergické kožní reakce. Acetaminofen má i dobrou gastrointestinální snášenlivost a neovlivňuje srážení krve (Lincová et al., 2005). Po předávkování se stává hepatotoxinem způsobujícím centrilobulární nekrózu (Halmes et al., 1996). Za toxickou dávku je považováno množství okolo 10 g až 15 g acetaminofenu (Lincová et al., 2005; Ahmed, 2011).

Acetaminofen je primárně konjugován s glukuronidem (zhruba 40 %) a sulfátem (20 - 40 %) na acetaminofen sulfát a acetaminofen glukuronid (obr. 2), které již nejsou farmakologicky aktivní. Méně než 5 % tohoto léku se vyloučí v nezměněné podobě (Bertram, 2006; Fry, 2011). Část dávky acetaminofenu (asi 15 %) je oxidována cytochromem P450 CYP2E1 na N-acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI), který je za normálních okolností konjugován s glutathionem, dále metabolizován a vyloučen (Ahmed, 2011; Fry, 2011). Toxické účinky NAPQI se tedy nijak neprojeví. Při podání vyššího množství tohoto léku dochází k saturaci glukuronidace a sulfatace, přičemž vzniká velké množství N-acetyl-p-benzochinoniminu. Postupně dochází k vyčerpání zásob glutathionu v játrech, ke zvyšování oxidačního stresu v buňce a k poškození buněk radikálovými reakcemi (Jaeschke et al., 2002; Jaeschke et Bajt, 2006). Na toto poškození jsou velmi citlivé především hepatocyty a buňky proximálních tubulů ledvin.



Obr. 2: Odbourávání acetaminofenu (upraveno dle Fry, 2011)

N-acetyl-p-benzochinonimin je velmi reaktivní sloučenina obsahující nepárový elektron a mající charakter volného radikálu. NAPQI se kovalentně váže na specifické proteiny, dojde k proteinové nitraci, což poruší jejich normální funkci a nastane tkáňové a orgánové poškození, především jater a ledvin (Jaeschke et al., 2002; Jaeschke et al., 2006; Ahmed, 2011). Dochází k produkci reaktivních forem kyslíku, porušení homeostázy Ca^{2+} , lipoperoxidaci, změně propustnosti mitochondriální membrány a inhibici mitochondriálního dýchání. Tyto procesy začínají již 1 hodinu po předávkování tímto analgetikem (Halmes et al., 1996; Roušar et al., 2010).

Oxidační stres způsobený reaktivními formami kyslíku a dusíku a také vzrůstající hladina Ca^{2+} vyvolají změnu v propustnosti mitochondriální membrány mnoha typů buněk včetně hepatocytů. Tento proces navodí mnoho dalších změn v oblasti mitochondrií. Dojde k vytvoření pórů ve vnitřní mitochondriální membráně, které umožní průnik molekul, poklesne mitochondriální membránový potenciál a zastaví se syntéza ATP. Rozsáhlé poškození jaderné DNA a rychlý úbytek funkčních mitochondrií vede k poškození buněčné membrány a nekróze hepatocytů (Jaeschke et Bajt, 2006; Smart et al., 2008). Futter et al. (2001) ve své studii uvádí, že po podání acetaminofenu došlo u potkanů k výraznému nárůstu sérových aktivit enzymů AST, ALT a GLDH. V jiné studii (O'Brien et al., 2000) byl nárůst aktivity GLDH v plazmě mnohem více znatelný oproti nárůstu aktivit AST a ALT vůči původním hodnotám při podání toxické dávky acetaminofenu. Také u alkalické fosfatázy došlo ke zvýšení aktivity. Při léčení intoxikace acetaminofenem se používají donátory $-\text{SH}$ skupin, například N-acetylcystein. Pomocí tohoto antidota se dodávají sulfhydrylové skupiny pro neutralizaci toxických metabolitů (Bertram, 2006).

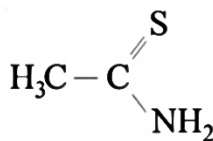
2.2.2.2 Toxické působení thioacetamidu na jaterní tkáň

Thioacetamid (TAA) patří mezi hepatotoxiny způsobující poškození jater. Thioacetamid (obr. 3) byl používán jako fungicid, organické rozpouštědlo a stabilizátor motorového oleje (Lee et al., 2003; Najmi et al., 2010). Jediná dávka TAA může vyvolat centrilobulární nekrózu, opakované podávání může vést k jaterní cirhóze a karcinomu jater (Staňková et al., 2010; Najmi et al., 2010). Prokázán byl i toxický účinek na thymus a ledviny (Najmi et al., 2010). Thioacetamid je vhodným modelovým hepatotoxinem stejně jako acetaminofen (Staňková et al., 2010).

Toxicita thioacetamidu je způsobená jeho aktivací v játrech pomocí cytochromu P450. Předpokládá se, že toxicita vzniká po vytvoření vysoce reaktivní sloučeniny thioacetamid-S-oxidu, který je příčinou mnoha změn (Najmi et al., 2010; Kadir et al., 2011). Dochází k produkci reaktivních forem kyslíku, jež jsou zodpovědné za oxidační stres. Následuje vyčerpání glutathionu, který hraje důležitou roli při detoxikaci reaktivních forem kyslíku, a oxidace buněčných makromolekul včetně lipidů. TAA také vyvolává uvolnění vápníku z nitrobuněčných zásob (Sanz et al., 2002; Staňková et al., 2010). Zvýšená tvorba reaktivních forem kyslíku a narušení homeostázy vápníku indukují zvýšení propustnosti vnitřní mitochondriální membrány, narušení mitochondriálního membránového potenciálu a inhibici mitochondriálního dýchání.

Tyto procesy vedou k nekróze jater, případně až k hepatocelulárnímu karcinomu (Bernardi et al., 2001; Najmi et al., 2010). Přesný mechanismus účinku thioacetamidu na energetický metabolismus buňky není zatím zcela objasněn (Staňková et al., 2010).

Po aplikaci TAA dochází k významnému zvýšení aktivity ALT, AST a ALP v séru, což je důsledek poškození jaterních buněk (Najmi et al., 2010; Kadir et al., 2011). Ve studii Giffen et al. (2002) nejvíce stoupala aktivita sorbitoldehydrogenázy a aspartátaminotransferázy po intoxikaci thioacetamidem. Aktivity ostatních enzymových markerů (GLDH, ALT a ALP) byly zvýšené také.



Obr. 3: Thioacetamid

2.3 Enzymové markery toxického poškození jater (*in vivo*)

Biochemickými markery toxického poškození jater (tab. II) jsou glutamátdehydrogenáza, gama-glutamyltransferáza, aspartátaminotransferáza, alaninaminotransferáza a alkalická fosfatáza. Žádný z dosud známých enzymových markerů není 100% specifický pro diagnostiku jaterního poškození. Použitím kombinací více biomarkerů se sice zvyšuje citlivost, ale specifita klesá (Ozretić et Krajnović-Ozretić, 1993; Kravos et Malešič, 2008). Působení hepatotoxinů vede k poškození hepatocytů a uvolnění enzymů do krve. Stanovením těchto enzymů lze mnohem dříve prokázat poškození jater, než jsou znatelné zevní či jiné příznaky (Kravos et Malešič, 2010).

Tab. II: Přehled enzymových markerů toxického poškození jater
(použitá data jsou převzata z Wood et al., 2004)

Název enzymu	Zkratka	Výskyt	Fyziologické hodnoty [U/l]; 25 °C	
			muži	ženy
Alkalická fosfatáza	ALP	játra, kosti, střevo, ledviny, placenta, leukocyty	130	126
Alaninaminotransferáza	ALT	játra, ledviny, svalová tkáň, erytrocyty	15,5	11,7
Aspartátaminotransferáza	AST	játra, kosterní svalovina, myokard, ledviny, mozek, plíce	12,1	10,7
Glutamátdehydrogenáza	GLDH	játra, mozek, testikulární tkáň, oko	3,4	3,1
Gama-glutamyltransferáza	GGT	játra, ledviny, mozek, slinivka břišní, slezina, střevo	31,6	20,8

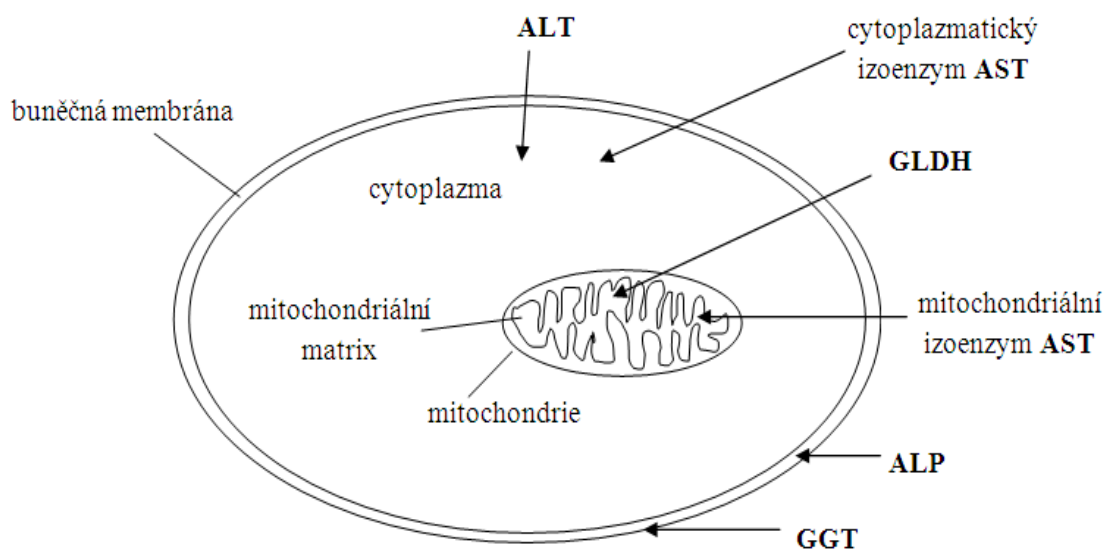
2.3.1 Aspartátaminotransferáza

Aspartátaminotransferáza (AST) katalyzuje transaminační reakci, při které vzniká z aspartátu oxalacetát (Limdi et Hyde, 2003). AST se vyskytuje v játrech, kosterní svalovině, myokardu, ledvinách, mozku, slinivce břišní, plicích a mnoha

dalších tkáních. Tento enzym je proto relativně málo specifický pro jaterní tkáň (Giffen et al., 2002; Conigrave et al., 2003; Limdi et Hyde, 2003). AST existuje ve dvou izoenzimech - mitochondriální a cytoplazmatická. V séru zdravých osob převažuje cytoplazmatický izoenzym AST, výskyt mitochondriálního izoenzymu AST značí nekrózu buněk. Hodnoty aktivity aspartátaminotransferázy jsou zvýšené mimo jiné u infarktu myokardu, onemocnění jater a kosterní svaloviny (Limdi et Hyde, 2003; Ozer et al., 2008).

2.3.2 Alaninaminotransferáza

Alaninaminotransferáza (ALT) je enzym katalyzující reverzibilní transaminační reakci vzniku pyruvátu. Vyskytuje se převážně v cytoplasmě (obr. 4) jaterních buněk. Dále ji můžeme nalézt také ve svalových a ledvinných buňkách a v erythrocytech. ALT patří mezi enzymy, které jsou specifické pro játra. Zvýšená aktivita alaninaminotransferázy a zároveň cytoplazmatické aspartátaminotransferázy v séru poukazuje na zvýšenou propustnost buněčné membrány u hepatocytů. Významné je tedy současné stanovení ALT, ale i stanovení poměru AST/ALT. Hodnoty tohoto poměru nad 1 nebo 2 svědčí o míře těžkého poškození jater. Zvýšená hladina ALT je také nalézána u akutní virové hepatitidy, chorob kosterní svaloviny a infarktu myokardu. V dospělosti je aktivita ALT i AST vyšší u mužů než u žen. U silně obézních osob je aktivita v séru o 40 % vyšší u obou enzymů. Míra zvýšení aminotransferáz odráží rozsah jaterního poškození, pokles aktivit může signalizovat ústup onemocnění, ale i rozšiřující se nekrózu (Limdi et Hyde, 2003; Ozer et al., 2008).



Obr. 4: Lokalizace enzymů v buňce

2.3.3 Gama-glutamyltransferáza

Gama-glutamyltransferáza (GGT) je enzym nacházející se v membráně buněk mnoha tkání, které mají exkreční nebo absorpční funkci. Nalezneme ho například v játrech, ledvinách, mozku, střevě, slezině a slinivce břišní. Nejvyšší aktivita GGT je v epiteliálních buňkách drobných žlučových. GGT se objevuje i v prostatě a seminálních váčcích, což je příčina vyšší aktivity GGT mužů. Rozšířená lokalizace enzymu je hlavním důvodem, proč GGT patří mezi méně specifické markery toxického poškození jater (Conigrave et al., 2003). GGT je enzym zajišťující transport gama-glutamylvé skupiny z gama-glutamylových peptidů na jiné peptidy, aminokyseliny nebo vodu (Ozer et al., 2008). Mnoho toxinů je schopno indukovat syntézu GGT v hepatocytech a dochází tak k výraznému zvýšení aktivity GGT v séru i v případě, že jaterní buňky nejsou nijak poškozeny. Jeho význam spočívá v ochraně buněčných membrán před oxidační destrukcí, v metabolismu mediátorů zánětu, karcinogenů a toxických xenobiotik (Goldberg, 1980). Zvýšená aktivita GGT je nalézána u cholestázy, nádorů jater a pankreatu, akutního i chronického hepatocelulárního poškození a obstrukčního ikteru. Aktivita GGT stoupá i při srdečním infarktu myokardu (Limdi et Hyde, 2003; Hannuksela et al., 2007; Turget et Tandogan, 2011).

2.3.4 Alkalická fosfatáza

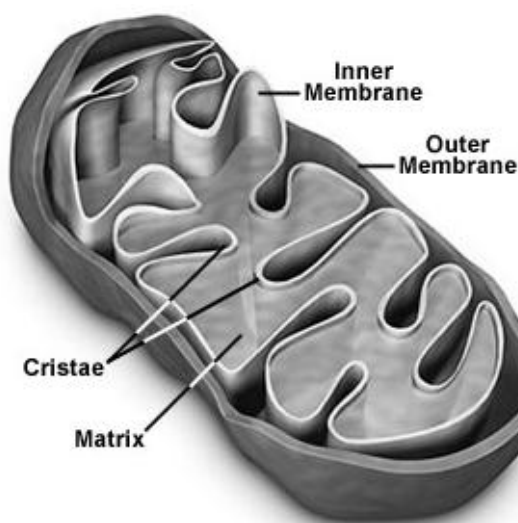
Alkalická fosfatáza (ALP) katalyzuje hydrolyzu monoesterů kyseliny fosforečné v alkalickém prostředí. Její fyziologická úloha v organismu není zcela objasněna. Nachází se především v játrech a kostech, ale nalezneme ji i ve střevě, ledvinách, placentě a leukocytech (Ozer et al., 2008). Rozlišují se 3 izoenzymy alkalické fosfatázy: kostní, střevní a jaterní izoenzym. V těhotenství se navíc vyskytuje placentární izoenzym. Celá skupina izoenzymů pro svoji aktivitu potřebuje zinek. Aktivita izoenzymů stoupá při stimulaci dané tkáně, ve které se izoenzym nachází. Alkalická fosfatáza stoupá ve třetím trimestru těhotenství, v dětství a pubertě, což je spojeno s růstem kostí (Limdi et Hyde, 2003). Patologický nárůst aktivity ALP se objevuje u obstrukce žlučových cest, léky indukované cholestázy, onemocnění kostí, metastazujících onemocnění jater a primární biliární cirhózy. Při cholestáze dochází k porušení membrán mechanickými vlivy i účinkem žlučových kyselin a alkalická fosfatáza uniká do systémové cirkulace (Limdi et Hyde, 2003; Wright et Vandenberg, 2007).

2.3.5 Glutamátdehydrogenáza

Glutamátdehydrogenáza (GLDH) je enzym katalyzující oxidační deaminaci glutamátu. Vyskytuje se zejména v játrech, ale nalezneme ji i v nervové a testikulární tkáni (Zaganas et al., 2009). Zvýšená činnost GLDH je zřejmě způsobena reverzibilním poškozením mitochondriální membrány hepatocytů, ne nekrózou. Toxiny oslabují cytoskelet hepatocytů, zvyšuje se propustnost mitochondriální membrány, uvolňují se enzymy a stoupá sérová aktivita GLDH (Kravos et Malešič, 2008). Glutamátdehydrogenáza slouží k diferenciaci jaterních onemocnění spolu s dalšími jaterními enzymy. V mnoha studiích byla popírána spolehlivost GLDH jako diagnostického markeru poškození hepatocytů. V některých odborných člancích zabývajících se problematikou markerů jaterního poškození není vůbec na glutamátdehydrogenázu brán zřetel (Conigrave et al., 2003). Nyní se GLDH ukazuje například jako jeden z nejvíce specifických a senzitivních markerů alkoholového poškození jater (Kravos et Malešič, 2010).

2.4 Glutamátdehydrogenáza

Glutamátdehydrogenáza je známa již více než 50 let. Za tuto dobu byla podrobně popsána její struktura i mechanismus působení (Li et al., 2002). Glutamátdehydrogenáza patří do třídy oxidoreduktáz. Vyskytuje se ve všech tkáních savců, převážně v mitochondriích buněk (obr. 5). Nejvíce je tento enzym zastoupen v jaterních buňkách. Jaterní tkáň vykazuje až desetkrát vyšší aktivitu než jiné tkáně. Vysoká aktivita GLDH je také nalézána v mozku, srdci, ledvinách, pankreatu, vaječnicích a varlatech. Funkce enzymu GLDH v těchto tkáních není stále plně charakterizována (Plaitakis et al., 2003).



Obr. 5: Struktura mitochondrie

(<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/mitochondria/mitochondria.html>)

2.4.1 Funkce glutamátdehydrogenázy

Glutamátdehydrogenáza se významně uplatňuje při metabolismu dusíku (katalyzuje oxidační deaminaci glutamátu) a hraje také důležitou roli v udržení energetické homeostázy (Ledvina et al., 2009). Glutamátdehydrogenázová reakce probíhá odštěpením 2 vodíkových iontů za vzniku meziprojektu α -iminoglutarátu, který je poté hydrolyzován, a vzniká α -ketoglutarát (reakce 1) a volný amoniak, který je dále odbouráván v Ornithinovém cyklu na močovinu (reakce 2). Reakce je reverzibilní, kromě deaminace dochází také k syntéze glutamátu z amoniaku a α -ketoglutarátu.

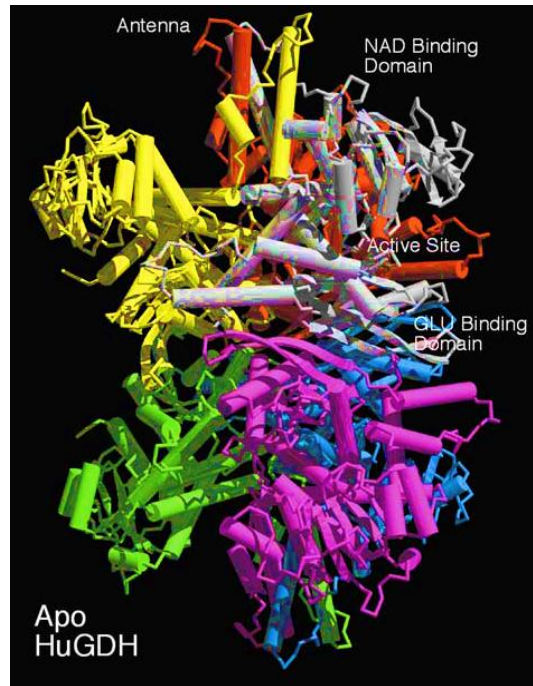


V glutamátdehydrogenázové reakci je zvýhodněna tvorba glutamátu před produkcí amoniaku. Tento stav napomáhá udržovat nízkou koncentraci amoniaku. Je fyziologicky podstatný, protože vysoká koncentrace amoniaku v organismu je toxická (McGivern et Chappell, 1975; Schmidt et Schmidt, 1988). Glutamátdehydrogenáza je jedním z enzymů, který může mít v některých organizmech jako redoxní koenzym NAD^+ i NADP^+ (Schmidt et Schmidt, 1988). NADH , který vzniká glutamátdehydrogenázovou reakcí, je možné následně využít pro syntézu ATP v dýchacím řetězci. Allosterická regulace enzymu glutamátdehydrogenázy je velmi důležitá v homeostáze inzulínu (Li et al., 2011). Regulace reakce je zajištěna přítomností purinových nukleotidů. Nukleotidy, které aktivitu GLDH allostericky inhibují, jsou adenzin trifosfát (ATP), guanozin trifosfát (GTP) a NADH . ATP má zhruba 100x nižší afinitu k enzymu než GTP. Dalšími inhibitory jsou palmitoyl koenzym A, steroidní hormony a diethylstilbestrol. Inhibice enzymu závislá na NADH se projevuje jen při vysokých nefyziologických koncentracích. Funkci opačnou mají ADP a guanozin difosfát (GDP), které v případě potřeby získávání energie stimulují degradaci glutamátu (Li et al., 2011).

Za fyziologického stavu je aktivita GLDH v séru zanedbatelná, avšak výrazně stoupá při nekróze jaterních buněk nebo neoplazii. Díky tomu lze GLDH použít jako vhodný biomarker toxického poškození jater (Ozer et al., 2008). Tento enzym patřil do nedávna ke spíše opomíjeným markerům. Z experimentů, které byly provedeny u potkanů, je patrné, že význam GLDH v poslední době narůstá. Zjistilo se, že jeho aktivita výrazně stoupá během hepatocelulárního poškození (O'Brien et al., 2002).

2.4.2 Struktura glutamátdehydrogenázy

Enzym glutamátdehydrogenáza je homoheksamer s molekulovou hmotností mezi 310 kDa a 350 kDa. Je složený z 505 aminokyselin (Kravos et Malešič, 2008). Každá jeho monomerní podjednotka má molekulovou hmotnost okolo 56 kDa a skládá se ze tří domén (obr. 6): glutamát-vázací domény, nikotinamidadenin dinukleotid-vázací domény a domény zvané anténa (Smith et al., 2002). Oblast antény se nenachází u glutamátdehydrogenázy hub, bakterií a rostlin (Smith et al., 2002; Li et al., 2011). NAD^+ -vázací doména obsahuje 48 zbytkových aminokyselin, které vycházejí z jejího vrcholu (Banerjee et al., 2003). NAD^+ -vázací doména může vázat kofaktor NAD^+ , ale i NADP^+ (Fisher, 1985; Smith et al., 2002).



Obr. 6: Struktura lidské glutamátdehydrogenázy - Apo forma (Smith et al., 2002)

Použité zkratky:

Active Site - aktivní místo

APO HuGDH - Apo forma lidské glutamátdehydrogenázy

GLU Binding Domain – glutamát-vázající doména

NAD Binding Domain – nikotinamidadeninukleotid-vázající doména

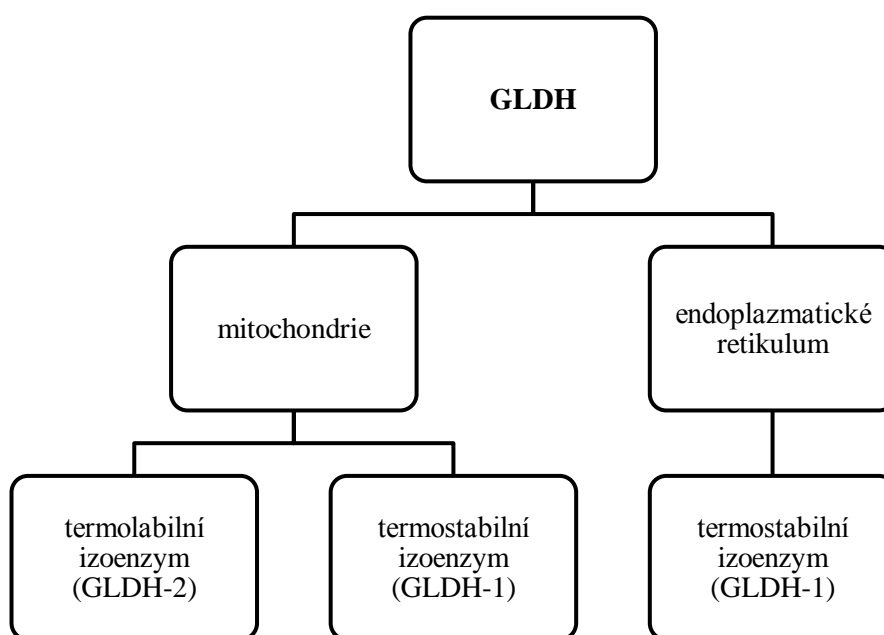
Homohexamer GLDH se skládá z 2 hlavních domén, které jsou od sebe odděleny velkou rýhou aktivního místa. V této rýze je místo vázající substrát. Doména I je také nazývána C-doména a doména II je nazývána N-doménou (Nakasuko et al., 2001). Každá doména je sestavena z centrálního β -řetězce, který je lemovaný α -šroubovicemi (Baker et al., 1997). Doména I je zodpovědná za přesné srovnání podjednotek do hexameru. Doména II je tvořena glutamát-vázající doménou a je složena hlavně z β -řetězců (Goda et al., 2005). NAD^+ -vázající domény jsou lokalizované na vrcholu N a C domén. Tyto domény se otáčejí na substrát a koenzym a zahajují katalýzu (Banerjee et al., 2003).

Různé druhy glutamátdehydrogenázy nalezneme u nižších eukaryot a bakterií. Nižší eukaryota, jako jsou např. *Saccharomyces cerevisiae* a *Neurospora crassa*, mají tetramerní GLDH s molekulovou hmotností podjednotky okolo 115 kDa. Některé bakterie mají molekulovou hmotnost podjednotky kolem 180 kDa. Objevuje se také uspořádání podjednotek do dimerů a hexamerů (Kawakami et al., 2010).

2.4.3 Glutamátdehydrogenáza a její izoenzymy

Glutamátdehydrogenáza existuje ve 2 izoenzimech (obr. 7), termostabilní (GLDH-1) a termolabilní (GLDH-2) formě (Mastorodemos et al., 2005; Kravos et Malešič, 2008; Pajič et al., 2009). Obě formy jsou katalyticky aktivní. Termostabilní forma lidské glutamátdehydrogenázy je kódovaná genem *GLUD1* lokalizovaným na 10. chromozomu (Deloukas et al., 1993) a obsahujícím 13 exonů (Michaelidis et al., 1993). Termolabilní forma je specifická pro nervovou (Kravos et Malešič, 2008; Pajič et al., 2009), testikulární tkáň a sítnici oka (Zaganas et al., 2009). Kóduje ji gen *GLUD2*, který je lokalizován na lidském chromozomu X (Kravos et Malešič, 2008). Tento izoenzym je rezistentní vůči GTP inhibici (Plaitakis et al., 2003; Mastorodemos et al., 2005), a aby mohl být katalyticky aktivní, potřebuje aktivátor adenosindifosfát (ADP) (Plaitakis et al., 2003).

Obě izoformy enzymů se složením téměř shodují, odlišují se pouze v 15 z celkových 505 aminokyselin (Plaitakis et al., 2003; Pajič et al., 2009). Základem hlavních funkčních rozdílů mezi GLDH-1 a GLDH-2 je záměna aminokyselin. Výměna Gly456 za L-alanin učiní enzym GLDH-2 rezistentním vůči GTP, aktivace prostřednictvím ADP a L-leucinem se nemění. Druhý rozdíl spočívá ve výměně Arg443 za L-serin. To způsobí, že GLDH-2 je inaktivní při absenci allosterických efektorů (Plaitakis et al., 2003).



Obr. 7: Přehled izoenzymů GLDH

2.4.4 Glutamátdehydrogenáza z drsného endoplazmatického retikula

Jak již bylo řečeno, GLDH se vyskytuje téměř výhradně v matrix mitochondrií. Studie ale prokazují, že se vyskytuje i v drsném endoplazmatickém retikulu, v termostabilní formě (Lee et al., 1999; Kravos et Malešič, 2008). Jedná se tedy o další izoenzym GLDH, který se svými vlastnostmi liší od mitochondriální GLDH (obr. 7). Glutamátdehydrogenáza purifikovaná z drsného endoplazmatického retikula je tepelně stabilnější a méně náchylná k proteolýze. To potvrzuje i experiment, který provedl Lee et al. (1999). Po 20 minutách inkubace izoenzymů při 42 °C klesla aktivita mitochondriální GLDH na 20 % původní hodnoty. Aktivita GLDH z drsného endoplazmatického retikula činila 80 % původní aktivity. Přítomnost tepelně stabilní glutamátdehydrogenázy v séru alkoholiků je také důkazem, že část GLDH pochází z drsného endoplazmatického retikula hepatocytů. Alkohol tedy poškozuje membránu mitochondrií, ale zda-li poškozuje i membránu endoplazmatického retikula není dosud známo (Kravos et Malešič, 2008). Rozdíl mezi jednotlivými izoenzymy nalezneme ale i ve specifitě kofaktorů. Mitochondriální GLDH má vyšší K_m pro $NADP^+$ než pro NAD^+ , zatímco u GLDH z endoplazmatického retikula je tomu naopak. Molekulární hmotnost obou izoenzymů GLDH je ale stejná (Lee et al., 1999).

2.4.5 Možnosti transportu glutamátu do mitochondrií

Podle některých studií by se funkce termolabilní glutamátdehydrogenázy (GLDH-2) mohla týkat metabolismu transportéru glutamátu, jako nervového mediátoru. Možnosti transportu glutamátu do mitochondrií jsou celkem dvě: přeměna glutamátu na aspartát a přímý transport glutamátu. Vnitřní membrána mitochondrií obsahuje 2 typy transportérů pro glutamát. První je aspartát-glutamátový přenašeč, který se vyskytuje ve všech tkáních. Glutamát vstupující do mitochondrií prostřednictvím tohoto přenašeče je transaminován na aspartát. Druhým typem transportéru je glutamátový přenašeč, jenž je pouze zdrojem externího glutamátu pro mitochondrie. Tento druh transportu je spojen s kotransportem H^+ iontů přes mitochondriální membránu. Glutamátový přenašeč je především v mozku a testikulární tkáni, stejně jako GLDH-2. Funkce tohoto izoenzymu ale není stále objasněna (Plaitakis et al., 2003).

2.4.6 Stanovení aktivity enzymu glutamátdehydrogenázy

Aktivita GLDH se nejčastěji stanovuje spektrofotometricky. Při tomto stanovení dochází k poklesu absorbance, který je způsobený oxidací NADH. Pokles absorbance za minutu se měří při vlnové délce 340 nm a je přímo úměrný aktivitě GLDH (Fisher, 1985; Lee et al., 1999). Německá společnost klinické biochemie doporučila v roce 1972 optimalizovanou standardní metodu pro stanovení glutamátdehydrogenázy s optimální koncentrací substrátu, nadbytkem NADH a aktivací GLDH přidavkem ADP (Kravos et Malešič, 2008). Optimální pH pro stanovení aktivity mitochondriální GLDH a GLDH z drsného endoplazmatického retikula je v rozmezí 7,4 - 8 (McCarthy et al., 1980; Hussain et al., 1989). Mezi nejčastěji používaný pufr patří sodno- a draselno- fosfátový (McCarthy et al., 1980; Bailey et al., 1982; Ozretić et Krajnović-Ozretić, 1993), méně často triethanolaminový (Jung et al., 1985).

Při stanovení aktivity enzymu glutamátdehydrogenázy v plazmě u zdravých lidí jsou znatelné velké rozdíly mezi hodnotami aktivit u mužů a u žen. Jung et al. (1985) ve své práci uvádí referenční hodnotu GLDH u mužů 11,0 U/l a u žen 6,4 U/l. Téměř dvojnásobná aktivita GLDH u mužů než u žen pravděpodobně souvisí s jejich intenzivnějším metabolismem (Kravos et Malešič, 2008). Aktivita glutamátdehydrogenázy stoupá s věkem, výrazněji to lze vidět opět u mužů (Wood et al., 2004). Vznikají ale i velké rozdíly referenčních intervalů mezi jednotlivými publikacemi. Například Kopáč (2004) ve své knize uvádí fyziologickou hodnotu GLDH u mužů do 14,4 U/l a u žen do 11,0 U/l. U novorozenců je referenční hodnota GLDH do 24 U/l. Poté postupně klesá (Kopáč, 2004). V jiných článcích můžeme nalézt naopak referenční rozmezí pro GLDH mnohem nižší (Ellis et Goldberg, 1972; Wood et al., 2004).

2.4.7 Defekt glutamátdehydrogenázy

Defekt tohoto enzymu způsobuje multiorgánovou chorobu - familiární hyperinzulinémickou hypoglykémii typu 6, též známou jako syndrom hyperinzulinizmu-hyperamonémie. Toto onemocnění je způsobené heterozygotní mutací v glutamátdehydrogenázovém genu (GLUD 1) lokalizovaném na chromozomu 10q23.3. Mutace byla identifikována v oblasti antény enzymu kódovaného exony 11 a 12, a také v oblasti kódované exony 6 a 7 (Stanley et al., 1998; Miki et al., 2000). Mutace způsobí znecitlivění GLDH na allosterickou inhibici pomocí GTP a aktivaci GLDH tak není nijak bráněno (Stanley et al., 1998). Dochází ke zvýšené rychlosti

oxidace glutamátu na α -ketoglutarát, který stimuluje sekreci inzulínu v β -buňkách pankreatu, a amoniak. V játrech je narušena detoxikace amoniaku (Stanley et al., 1998; Miki et al., 2000).

Osoby postižené touto chorobou trpí hypoglykémií po příjmu potravy s vysokým obsahem proteinů (Zammarchi et al., 1996). Dochází u nich k nekontrolovanému katabolizmu aminokyselin. Zvyšuje se hladina ATP, která stimuluje sekreci inzulínu. Ztráta inhibice závislé na GTP vyústí v porušení mnoha mechanismů a poškození orgánů. Nadměrná stimulace endokrinního pankreatu způsobí zvýšenou sekreci inzulínu, čímž se snižuje hladina glukózy v krvi až na život ohrožující úroveň. V játrech, případně v ledvinách, vzniká z glutamátu velké množství volného amoniaku. Snížená koncentrace glutamátu způsobí nižší produkci N-acetylglutamátu. Tato látka je potřebným aktivátorem karbamoylfosfátsyntetázy, která je důležitá v procesu tvorby močoviny (Bailey et al., 1982; Li et al., 2011). Sníženým odbouráváním amoniaku stoupá jeho hladina v krvi, což je pro organismus toxické a způsobí mnoho dalších poškození. Byly provedeny studie, které dokazují souvislost mezi tímto syndromem a výskytem poškození centrální nervové soustavy, kdy se u nemocných objevují záchvaty epilepsie a poruchy učení (Bahi-Buisson et al., 2008; Balasubramaniam et al., 2011).

2.5 Porovnání enzymových markerů hepatotoxicity

Účinkem toxinů dochází v organismu k různým poškozením, která zahrnují i porušení membrány mitochondrií. Následkem toho dojde k uvolnění jejich obsahu, což můžeme v séru pozorovat vzrůstající hladinou enzymových biomarkerů: AST, ALT, GGT, GLDH a ALP. Enzymové markery nemusíme hodnotit pouze každý zvlášť, nýbrž i jejich vzájemný poměr může sloužit jako nástroj pro rozlišení druhu jaterního onemocnění (tab. III).

Tab. III: Diferenciální diagnostika jaterních chorob (Kopáč, 2004)

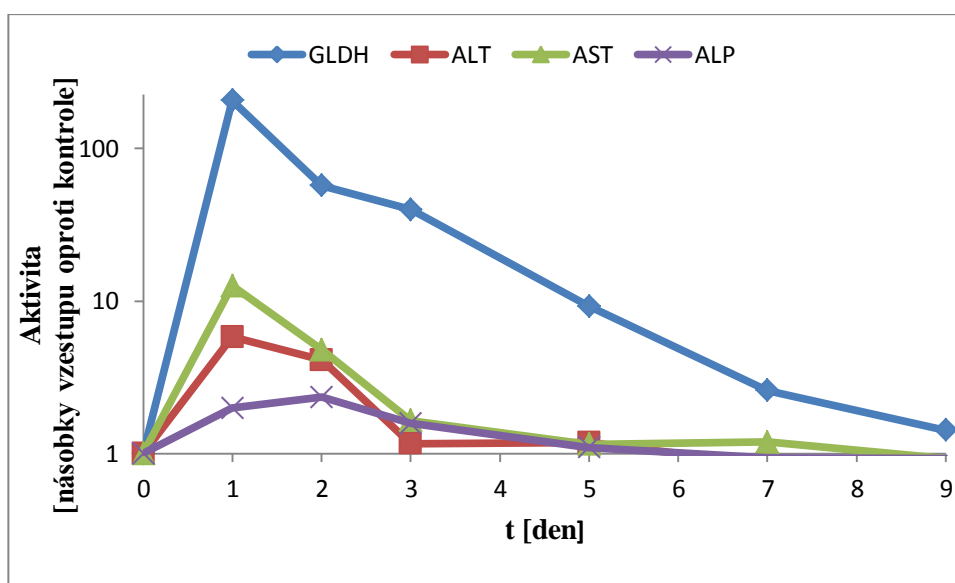
Poměr (ALT+AST)/GLDH	Jaterní choroby
< 20	Obstrukční ikterus
	Tumor
	Cirhóza
	Jaterní hypoxie
	Akutní selhání jater způsobené např. otravou amanitinem
20 - 50	Hepatální cholestáza
	Chronická aktivní hepatitida
	Jaterní cirhóza - aktivní fáze
> 50	Akutní virová hepatitida
	Cholestatická hepatitida
	Akutní alkoholová hepatitida

V experimentu, který provedl Kravos et Malešič (2010), byla sledována aktivita enzymů (GLDH, GGT, AST a ALT) u alkoholiků. Ve všech případech byly hodnoty aktivit enzymů vyšší než u zdravých osob. Zvýšení sérové aktivity AST je závažnější než vzestup hladiny ALT a signalizuje nekrózu jaterní tkáně. Nejrychlejší pokles aktivity bylo možné sledovat u GLDH. Aktivita GLDH začala klesat téměř ihned po začátku abstinence, zatímco aktivita GGT klesala nejdříve za 4 - 5 dnů. Nejvíce specifickým laboratorním markerem byla v této studii taktéž GLDH, její specifita činila 90 %. Specifita enzymu AST dosahovala nepatrně nižší hodnoty. Senzitivita GLDH se rovnala 76 %, AST 68 %. Obě enzymové aktivity byly srovnatelné pravděpodobně kvůli tomu, že jsou tyto enzymy uvolňovány stejným mechanismem z mitochondrií (Kravos et Malešič, 2010). V jiné studii došlo po expozici jaterní tkáně toxinům, tetrachlormethanu a fenolu, také k vzestupu aktivit GLDH a ALP. Aktivita GLDH

se zvýšila až 27x oproti původním hodnotám (Ozretić et Krajnović-Ozretić, 1993).

Po částečné hepatektomii vzrostla aktivita enzymů v plazmě na maximální hodnoty již během prvního dne. Vzestup aktivity glutamátdehydrogenázy je nepřehlédnutelný, hodnota aktivity se zvýšila 205x oproti kontrolní plazmě. U ostatních enzymů nebyl nárůst aktivity tak razantní, aktivita AST vzrostla 6x, ALT 13x a ALP pouze 2x (graf 1). Glutamátdehydrogenáza je považována za významný marker i kvůli prodloužené době přetrvávání v krvi následně po poškození. Ačkoliv hladiny aktivity ALT, AST a ALP klesly na původní hodnotu již během 3 dnů po poškození, aktivita GLDH zůstávala zvýšená i po 5 dnech (O'Brien et al., 2002). Výrazný vzestup GLDH je znatelný i ve studii O'Brien et al. (2000). Aktivita GLDH po acetaminofenem indukovaném poškození jater vzrostla 23x oproti kontrole, zatímco hodnoty ostatních enzymů (AST, ALT a ALP) vzrostly maximálně o 50 % (O'Brien et al., 2000).

Porovnáním senzitivity biomarkerů akutního hepatotoxického poškození bylo zjištěno, že nejvíce senzitivní marker je glutamátdehydrogenáza. Její aktivita stoupá velice rychle, mnohem dříve než třeba aktivita ALT. Původně byla upřednostňována ALT jako marker poškození jaterních buněk. Bohužel ALT může poskytovat falešně pozitivní výsledky, pokud je používána jako biomarker poškození jater. Její aktivita je totiž značně vysoká i při poškození kosterní svaloviny či jiných toxicky poškozených orgánů. Enzymový marker GGT je považován také za citlivější test u onemocnění jater než ALP (O'Brien et al., 2002).



Graf 1: Změna aktivity enzymů v plazmě po částečné hepatektomii (použitá data jsou převzata z O'Brien et al., 2002)

3. Cíl práce

1. Otestovat vliv různých metodických parametrů na stanovení aktivity glutamátdehydrogenázy a následně určit optimální postup pro stanovení.
2. Stanovit aktivitu glutamátdehydrogenázy v séru potkanů pomocí optimalizované metody.
3. Porovnat získané výsledky aktivity glutamátdehydrogenázy v séru s aktivitami ostatních enzymů používaných při hodnocení toxického poškození jater (AST, ALT, ALP) a vyhodnotit použití glutamátdehydrogenázy jako markeru hepatotoxicity.

4. Experimentální část

4.1 Seznam použitých chemikálií

Deionizovaná voda - ($G < 0,1 \mu\text{S}$)

L-glutamátdehydrogenáza - GLDH; 12 mg proteinu/ml; 45 U/mg proteinu;
Sigma-Aldrich SRN

Hydrogenfosforečnan draselný - K_2HPO_4 ; $M_r = 174,18 \text{ g/mol}$; Sigma-Aldrich
SRN

Hydrogenfosforečnan sodný - Na_2HPO_4 ; $M_r = 141,96 \text{ g/mol}$; Sigma-Aldrich SRN

Hydroxid sodný - NaOH ; $M_r = 40 \text{ g/mol}$; Fluka Biochemika SRN

Chlorid amonný - NH_4Cl ; $M_r = 53,49 \text{ g/mol}$; Sigma-Aldrich SRN

α -ketoglutarát - $\text{C}_5\text{H}_5\text{NaO}_5$; $M_r = 168,08 \text{ g/mol}$; Sigma-Aldrich SRN

Kyselina ethylendiamintetraoctová - EDTA; $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
 $M_r = 372,24 \text{ g/mol}$; Fluka Biochemika SRN

Kyselina chlorovodíková - HCl ; $M_r = 36,46 \text{ g/mol}$; Fluka Biochemika SRN

β -nikotinamidadenin dinukleotid redukovaný - NADH; $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{Na}_2\text{O}_{14}\text{P}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$;
 $M_r = 709,4 \text{ g/mol}$; Sigma-Aldrich SRN

Octan amonný - $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$; $M_r = 77 \text{ g/mol}$; Sigma-Aldrich SRN

Triethanolaminový pufr - $(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_3\text{N} \cdot \text{HCl}$; $M_r = 185,65 \text{ g/mol}$;
Sigma-Aldrich SRN

4.2 Příprava roztoků

- **pufr Na₂HPO₄**: c = 0,1 M; pH = 7; 7,3; 7,5; 8

Ve 160 ml deionizované vody jsme rozpustili 2,27 g Na₂HPO₄. Roztok pufru jsme rozdělili po 40 ml do 4 kádinek. Pomocí pH měrné elektrody jsme upravili jeho pH na potřebné hodnoty. Původní roztok měl pH 9,2. K úpravě pH jsme použili 1 M HCl. Takto připravené pufrы jsme uchovávali při 4 °C.

- **triethanolaminový pufr**: c = 0,1 M; pH = 7,3

Ve 100 ml deionizované vody jsme rozpustili 1,86 g C₆H₁₅NO₃.HCl. Pomocí pH měrné elektrody jsme změřili jeho hodnotu pH, činila 4,9. Přidáním 0,1 M NaOH jsme pH upravili na hodnotu 7,3. Triethanolaminový pufr jsme skladovali při 4 °C.

- **pufr K₂HPO₄**: c = 0,1 M; pH = 6; 7; 7,3; 7,5; 7,8; 8; 9

Ve 140 ml deionizované vody jsme rozpustili 2,44 g K₂HPO₄. Roztok pufru jsme rozdělili po 20 ml do kádinek. Pomocí pH měrné elektrody jsme změřili jeho pH - původní roztok měl pH 9. K úpravě pH jsme použili 1 M HCl. Takto připravené pufrы jsme uchovávali při 4 °C.

- **zásobní roztok α-ketoglutarát (α-KG)**: c = 0,806 M

Ve 20 ml deionizované vody jsme rozpustili 2,709 g α-KG. Při stanovení jsme také využili 0,2 M α-KG, který jsme připravili rozpuštěním 0,336 g v 10 ml deionizované vody. Potřebovali jsme i 5 mM α-KG. V 10 ml sodno-fosfátového pufru jsme rozpustili 0,0084 g α-KG. Takto připravené roztoky jsme uchovávali při 4 °C.

- **zásobní roztok NADH**: c = 16 mM

V 5 ml deionizované vody jsme rozpustili 0,056 g NADH. Pro analýzu jsme potřebovali i roztok o koncentraci 53 mM, který jsme zhotovili rozpuštěním 0,075 g NADH ve 2 ml deionizované vody. Takto připravené roztoky jsme rozpipetovali do mikrozkuhavek po 400 μl a skladovali v mrazáku při -20 °C.

- **zásobní roztok EDTA**: c = 2,5 mM

Ve 100 ml deionizované vody jsme rozpustili 0,093 g EDTA. Během analýzy jsme také využili roztok 25 mM EDTA, který jsme připravili v 10 ml deionizované vody rozpuštěním 0,093 g EDTA. Roztokы jsme skladovali při 4 °C.

- **roztok NH₄Cl:** $c = 3 \text{ M}$

V 30 ml sodno-fosfátového pufru pH 7,5 jsme rozpustili 4,81 g NH₄Cl. Takto připravený roztok jsme skladovali při 4 °C.

- **roztok NH₄Ac:** $c = 3,2 \text{ M}$

V 5 ml deionizované vody jsme rozpustili 1,23 g octanu amonného. Roztok jsme skladovali při 4 °C.

- **zásobní roztok bovinní glutamátdehydrogenázy (GLDH):** $c = 250 \text{ mU/ml}$

K 1620 ml deionizované vody jsme napipetovali 3 µl enzymu GLDH (540 U/ml). Takto připravený roztok měl aktivitu 1 U/ml. Z roztoku jsme odebrali 250 µl a přidali k 750 µl deionizované vody. Námí připravený roztok měl aktivitu 250 mU/ml. Zásobní roztok GLDH jsme skladovali během dne při 4 °C. Každý den jsme z důvodu nestability GLDH připravovali nový zásobní roztok.

- **roztok NaOH:** $c = 0,1 \text{ M}$

V 50 ml deionizované vody jsme rozpustili 0,2 g NaOH. Roztok jsme skladovali při 4 °C.

- **roztok HCl:** $c = 1 \text{ M}$

K 18,1 ml deionizované vody jsme přidali 1,9 ml 32% HCl. Roztok jsme uchovávali při 4 °C.

4.3 Přístroje a laboratorní vybavení

Analytické váhy ARJ 120-4M – Kern, Německo

Automatické pipety Finnpiette – Thermo corporation, Finsko

Hlubokomrazicí box – Sanyo, Japonsko

Kombinovaná lednice s mrazákem Electrolux 3046 – Electrolux, Německo

Laboratorní sklo a plasty, kádinky, odměrné válce, mikrozkušky

Magnetické míchadlo Big Squid Star – Německo

Mikrotitrační destičky 96-jamek – Nunclon Surface, Dánsko

pH-měrná elektroda Sen Tix 81 – Fisher Scientific, Rakousko

pH-metr pH720 – InoLab, Německo

Rotační třepačka Reax top – Heidolph, Německo

Software – i-control 1.6 for infinite reader, Microsoft Office Word 2010,
Microsoft Office Excel 2010

Spektrofotometrická a fluorimetrická čtečka Infinite M200 – Tecan, Rakousko

Stepper Finnpiette (10-5000 μ l) – Thermo corporation, Finsko

Váhy 440-35N – Kern, Německo

4.4 Podmínky stanovení aktivity glutamátdehydrogenázy

Aktivitu glutamátdehydrogenázy jsme stanovovali spektrofotometricky (tab. IV) pomocí přístroje Tecan Infinite M200. Během analýzy dochází k poklesu absorbance, který je způsobený oxidací NADH. Pokles absorbance za minutu jsme měřili při vlnové délce 340 nm po dobu 10 minut. Tento pokles absorbance je přímo úměrný aktivitě GLDH, kterou jsme vypočítali podle Lambert-Beerova zákona (tab. V).

Tab. IV: Podmínky stanovení aktivity GLDH

Počet kinetických cyklů	20
Celková doba měření	10 min
Časový interval	30 s
Mód	absorbance
Vlnová délka	340 nm
Štěrbina	9 nm
Počet záblesků	25
Teplota	25 °C

Tab. V: Výpočet aktivity dle Lambert-Beerova zákona

$A = \epsilon \cdot c \cdot l$	Lambert-Beerův zákon
A	Absorbance
ϵ	Molární extinkční koeficient
c	Molární koncentrace
l	Délka absorbující vrstvy
ϵ (NADH, 340 nm)	Molární extinkční koeficient pro NADH při 340 nm = $622 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$
l (V = 310 μl)	Délka absorbující vrstvy pro objem 310 μl = 0,00905 m
$\Delta A/\text{min}$ [min^{-1}]	Pokles absorbance za minutu
F	Ředící faktor
$A = ((\Delta A/\Delta t)/(\epsilon \cdot l)) \cdot 10^3 \cdot F$ [mU/ml]	Rovnice pro výpočet aktivity GLDH

4.5 Stanovení aktivity glutamátdehydrogenázy

4.5.1 Optimalizace koncentrace NADH

Cílem pokusu v rámci optimalizace bylo určit optimální koncentraci NADH pro stanovení aktivity glutamátdehydrogenázy. Sledovali jsme změny hodnot aktivity tohoto enzymu v přítomnosti různě koncentrovaného NADH a 2 odlišných pufrů: sodno-fosfátového (PB) a triethanolaminového (TEA).

Nejprve jsme ke stanovení použili sodno-fosfátový pufr. Ředěním 16 mM roztoku NADH dvojkovou řadou v deionizované vodě jsme připravili různě koncentrované roztoky NADH (tab. VI). Do jamky jsme napipetovali 20 μ l pracovního roztoku GLDH. Před měřením jsme přidali 290 μ l následující směsi: 240 μ l PB (0,1 M); 10 μ l EDTA (2,5 mM); 20 μ l NH_4Cl (3 M); 10 μ l α -KG (5 mM) a 10 μ l NADH (16 mM). Takto jsme postupovali i s dalšími koncentracemi NADH. Koncentrace NADH, které jsou uvedené ve výsledcích, jsou skutečné koncentrace NADH v jamce mikrotitrační destičky.

Tab. VI: Příprava řady koncentrací NADH při použití sodno-fosfátového pufru

Koncentrace NADH	Objem NADH	Objem DV
16,0 mM	1000 μ l NADH (16,0 mM)	0 μ l
8,0 mM	500 μ l NADH (16,0 mM)	500 μ l
4,0 mM	500 μ l NADH (8,0 mM)	500 μ l
2,0 mM	500 μ l NADH (4,0 mM)	500 μ l

Dále jsme při stanovení optimální koncentrace NADH použili triethanolaminový pufr. Ze zásobního roztoku 53 mM NADH jsme připravili koncentrační řadu NADH (tab. VII). Do jamky jsme napipetovali 20 μ l pracovního roztoku GLDH a těsně před měřením přidali 290 μ l směsi složené z následujících reagentů: 260 μ l TEA (0,1 M); 3 μ l EDTA (0,025 M); 4 μ l NH_4Ac (3,2 M); 20 μ l α -KG (0,2 M) a 3 μ l NADH (53 mM). Stejný postup jsme aplikovali i u zbývajících koncentrací NADH. Výsledný objem v jamce byl vždy 310 μ l. Při stanovení aktivity GLDH jsme dodržovali podmínky uvedené v tab. IV.

Tab. VII: Příprava řady koncentrací NADH při použití triethanolaminového pufru

Koncentrace NADH	Objem NADH	Objem DV
53,0 mM	1000 μ l NADH (53,0 mM)	0 μ l
26,5 mM	500 μ l NADH (53,0 mM)	500 μ l
13,3 mM	500 μ l NADH (26,5 mM)	500 μ l
6,6 mM	500 μ l NADH (13,3 mM)	500 μ l

4.5.2 Optimalizace koncentrace α -ketoglutarátu

Pro zjištění optimální koncentrace substrátu α -ketoglutarátu jsme využili dvou rozdílných pufrů - sodno-fosfátový a triethanolaminový pufr. Optimální koncentraci α -ketoglutarátu jsme určili z vlivu tohoto substrátu na aktivitu glutamátdehydrogenázy.

Nejprve jsme použili ke stanovení aktivity GLDH sodno-fosfátový pufr. Zásobní roztok α -KG o koncentraci 806 mM jsme naředili deionizovanou vodou na roztoky o koncentracích 403 mM; 40,3 mM a 4,03 mM. Podrobnosti ředění jsou uvedeny v tab. VIII. Do jamky jsme napipetovali 20 μ l pracovního roztoku GLDH a neprodleně před měřením jsme přidali 240 μ l PB (0,1 M); 10 μ l NADH (6,2 mM); 10 μ l EDTA (2,5 mM); 20 μ l NH_4Cl (3 M) a 10 μ l α -KG (806 mM). Tento postup jsme opakovali i s dalšími třemi koncentracemi α -KG. Výsledný objem v jamce činil 310 μ l. Aktivitu GLDH jsme stanovovali podle podmínek uvedených v tab. IV. Koncentrace α -ketoglutarátu, které jsou uvedené ve výsledcích, jsou skutečné koncentrace tohoto substrátu v jamce mikrotitrační destičky.

V dalším kroku optimalizace koncentrace α -KG jsme použili triethanolaminový pufr. Koncentrace α -KG zůstaly stejné jako při testování sodno-fosfátového pufru. Do jamky jsme napipetovali 20 μ l pracovního roztoku GLDH. Těsně před měřením jsme přidali 260 μ l TEA (0,1 M); 3 μ l NADH (6,2 mM); 3 μ l EDTA (25 mM); 4 μ l NH_4Ac (3,2 M) a 20 μ l α -KG (806 mM). Výsledný objem v jamce byl 310 μ l. Takto jsme postupovali i při měření zbylých 3 koncentrací α -KG. Podmínky stanovení byly stejné s podmínkami uvedenými v tab. IV.

Tab. VIII: Příprava řady koncentrací α -ketoglutarátu

Koncentrace α -KG	Objem α -KG	Objem DV
806,0 mM	1000 μ l α -KG (806,0 mM)	0 μ l
403,0 mM	500 μ l α -KG (806,0 mM)	500 μ l
40,3 mM	100 μ l α -KG (403,0 mM)	900 μ l
4,0 mM	100 μ l α -KG (40,3 mM)	900 μ l

4.5.3 Optimalizace pH

Testovali jsme vliv pH na stanovení aktivity glutamátdehydrogenázy. Použili jsme sodno-fosfátový (pH 7; 7,5; 8) a draselno-fosfátový pufr (pH 7; 7,5; 8; 9,5).

Do jamky jsme napipetovali 20 μ l pracovního roztoku GLDH a těsně před měřením jsme přidali směs následujících reagensů: 240 μ l PB (0,1 M) o pH 7; 10 μ l NADH (6,2 mM); 10 μ l EDTA (2,5 mM); 20 μ l NH_4Cl (3 M) a 10 μ l α -KG (0,403 M). Výsledný objem v jamce byl 310 μ l. Takto jsme postupovali i s dalšími hodnotami pH a stejný postup jsme využili pro draselno-fosfátový pufr. Podmínky stanovení aktivity GLDH jsou uvedené v tab. IV.

4.5.4 Testování stability glutamátdehydrogenázy

4.5.4.1 Testování teplotní stability glutamátdehydrogenázy

Zjišťovali jsme, do jaké míry je glutamátdehydrogenáza stabilní v závislosti na teplotě uchování tohoto enzymu. GLDH jsme skladovali při 4 °C a při pokojové teplotě 25 °C.

Připravili jsme pracovní roztok GLDH, rozdělili ho do 2 mikrokumavek po 800 μ l a v daných časových intervalech (0, 1, 2, 3, 4, 48 h) jsme měřili jeho aktivitu. Během analýzy jsme mikrokumavky uchovávali při 4 °C a při 25 °C. Do mikrotitrační destičky jsme napipetovali 20 μ l pracovního roztoku GLDH a těsně před měřením jsme přidali směs složenou z následujících reagensů: 240 μ l KP (0,1 M); 10 μ l NADH (6,2 mM); 10 μ l α -KG (0,403 M); 10 μ l EDTA (2,5 mM) a 20 μ l NH_4Cl (3 M). Celkový objem v jamce byl 310 μ l. Stanovení aktivity GLDH jsme prováděli za podmínek, které jsou uvedené v tab. IV.

4.5.4.2 Testování stability glutamátdehydrogenázy při skladování

Testovali jsme vliv skladování glutamátdehydrogenázy na její stabilitu. GLDH jsme skladovali při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 měsíce. Stanovení aktivity jsme provedli v určitých časových intervalech - neprodleně po přípravě, po 2 dnech, 1 týdnů a 1 měsíci.

Připravili jsme pracovní roztok GLDH, rozpipetovali ho do 8 mikrozkušavek po $200\text{ }\mu\text{l}$, z toho 4 mikrozkušavky jsme skladovali při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a zbylé 4 mikrozkušavky při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. V takto připravených vzorcích jsme po určitých časových intervalech testovali aktivitu dle postupu uvedeného v bodě 4.5.4.1. Stanovení aktivity jsme prováděli vždy stejným způsobem a za stejných podmínek zaznamenaných v tab. IV.

4.5.5 Stanovení aktivity enzymových markerů v séru potkanů

Použili jsme krevní séra připravená v rámci pokusu s potkaními samci kmene Wistar (220 - 260 g). Pokusy byly schváleny Etickou komisí pro práci se zvířaty Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Potkani měli po celou dobu pokusu přístup ke standardní laboratorní dietě (Velaz, Česká republika) a vodě *ad libitum*.

Provedení pokusu: všem potkanům rozděleným do 4 skupin po 6 potkanech (tab. IX) byla 4x aplikována dávka acetaminofenu (APAP) v dávce 50 mg APAP/100 g hmotnosti (v objemu 0,5 ml suspenze/100 g váhy potkana). Tyto dávky byly aplikovány 1., 3., 5. a 7. den intragastrickou sondou. Následný den byli potkani operováni. U skupin č. 1 a 2 byla v etherové narkóze provedena laparotomie, u skupin č. 3 a 4 byla provedena parciální hepatektomie, tj. odnětí 65-70 % jater. Potkani byli usmrceni 10. a 11. den počítaný od podání první dávky APAP, v těchto intervalech byla i odebrána z břišní aorty krev, která byla ponechána koagulovat. Následnou centrifugací bylo připraveno krevní sérum, které bylo skladováno při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do doby stanovení enzymových aktivit.

Tab. IX: Popis skupin potkanů

	Acetaminofen - dávka	Operační zákrok	Doba usmrcení
Skupina 1	4x 50 mg APAP/100 g	laparotomie	24 hod.
Skupina 2	4x 50 mg APAP/100 g	parciální hepatektomie	24 hod.
Skupina 3	4x 50 mg APAP/100 g	laparotomie	48 hod.
Skupina 4	4x 50 mg APAP/100 g	parciální hepatektomie	48 hod.

4.5.5.1 Stanovení aktivity GLDH ve vzorcích sér potkanů

S ohledem na výsledky optimalizace dílčích parametrů analýzy (0,1 M draselno-fosfátový pufr (pH 7,5); 6,2 mM NADH; 0,403 M α -KG; 2,5 mM EDTA; 3 M NH_4Cl ; 25 °C) jsme za těchto parametrů provedli stanovení aktivity GLDH ve vzorcích sér potkanů i proměření blanků u jednotlivých vzorků. Při výpočtu výsledné glutamátdehydrogenázové aktivity v séru jsme hodnoty slepých vzorků odečetli od aktivity GLDH stanovené ve vzorku.

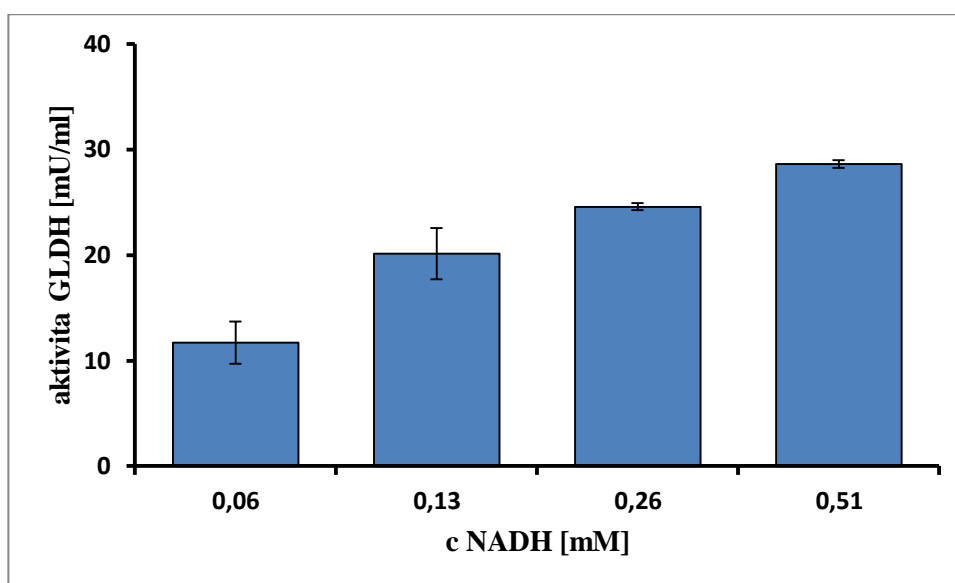
4.5.5.2 Stanovení aktivity ALT, AST, ALP ve vzorcích sér potkanů

Sérové aktivity ALT, AST a ALP byly ve vzorcích stanoveny na Oddělení klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové.

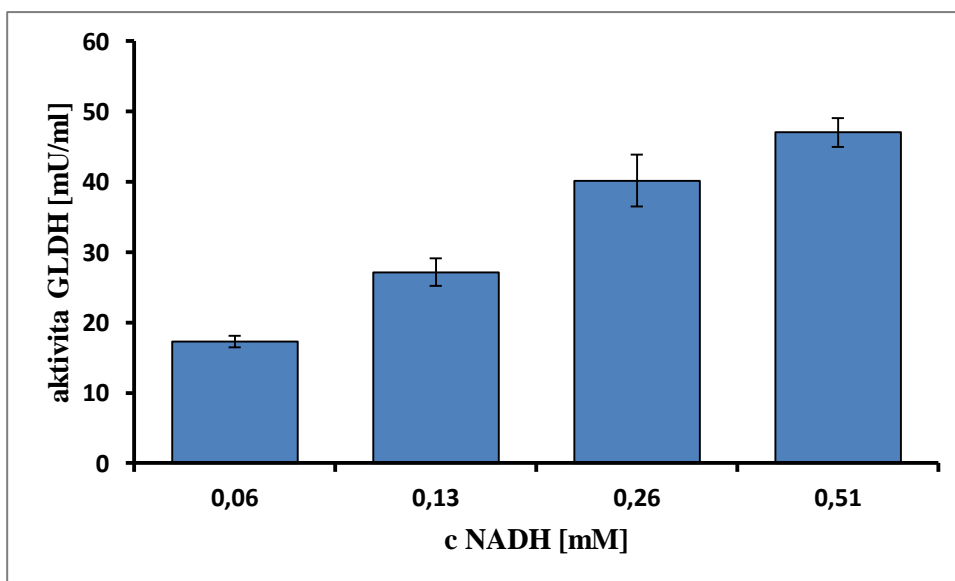
5. Výsledky

5.1 Optimalizace koncentrace NADH

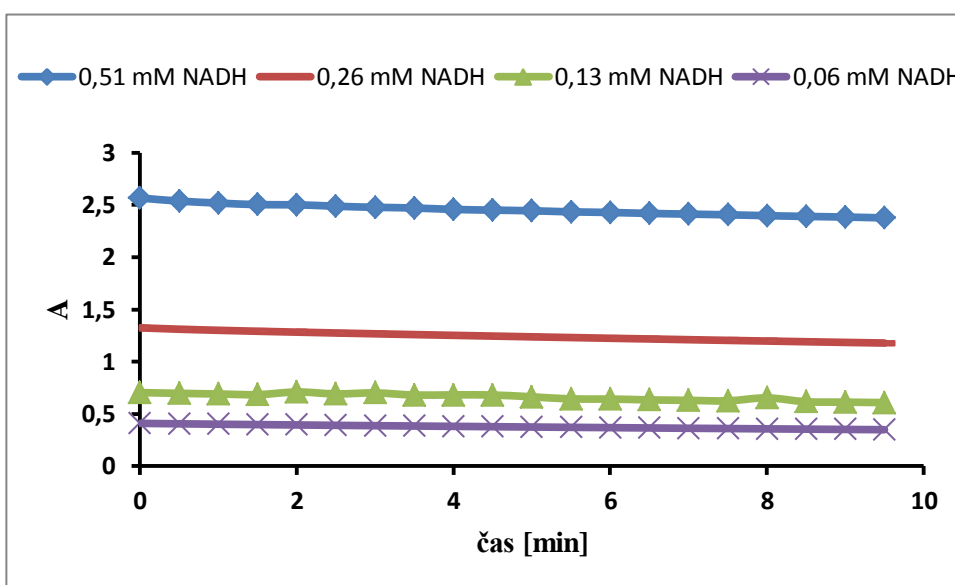
Testovali jsme vliv změny koncentrace NADH na aktivitu glutamátdehydrogenázy. Ke stanovení jsme použili 2 různé pufrы a koncentrace v rozmezí 0,06 - 0,51 mM NADH. Hodnota aktivity GLDH v prostředí triethanolaminového pufru (graf 2) byla nižší než při použití sodno-fosfátového pufru (graf 3), cca o 30 – 40 % v přítomnosti totožné koncentrace NADH. Z obou grafů je patrné, že s klesající koncentrací NADH klesá ve všech případech i aktivita GLDH. V přítomnosti všech koncentrací NADH bylo dosaženo linearity stanovení $\Delta A/\Delta t$ během celé doby měření (graf 4). Z ekonomických důvodů jsme zvolili jako optimální koncentraci 0,2 mM NADH, neboť se nalézala mezi koncentracemi 0,26 mM a 0,13 mM NADH. Jednotlivé hodnoty aktivit GLDH jsou zaznamenány v příloze 1 a 2.



Graf 2: Vliv koncentrace NADH na aktivitu GLDH při použití triethanolaminového pufru.
 Podmínky stanovení: GLDH; 0,1 M TEA; 12,9 mM α -KG; 25 mM EDTA; 3,2 M NH_4Ac ;
 25 °C; průměr \pm SD; n = 3.



Graf 3: Vliv koncentrace NADH na aktivitu GLDH při použití sodno-fosfátového pufru.
 Podmínky stanovení: GLDH; 0,1 M PB; 0,16 mM α -KG; 2,5 mM EDTA; 3 M NH_4Cl ;
 25 °C; průměr \pm SD; n = 3.

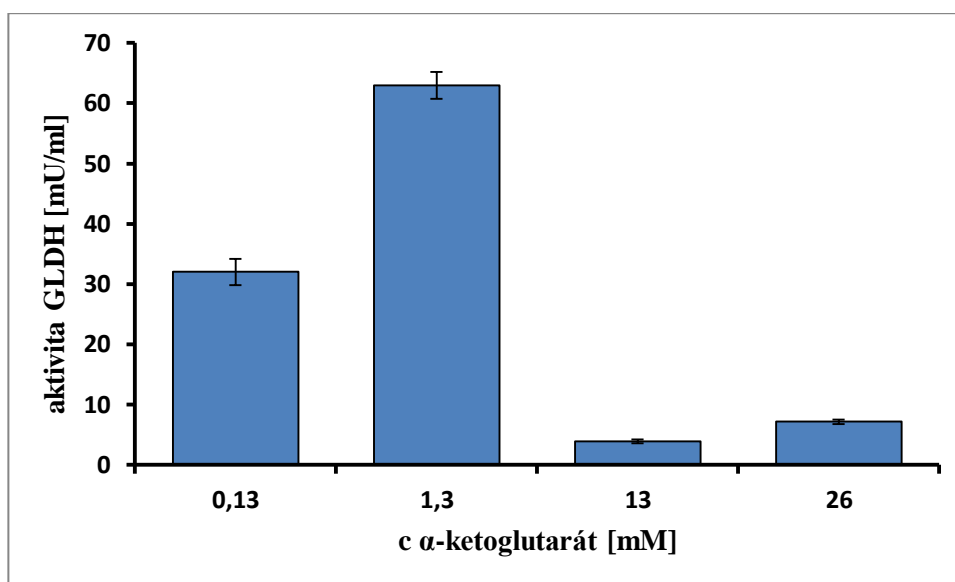


Graf 4: Vliv koncentrace NADH na aktivitu GLDH při použití sodno-fosfátového pufru.
 Podmínky stanovení: GLDH; 0,1 M PB; 0,16 mM α -KG; 2,5 mM EDTA; 3 M NH_4Cl ;
 25 °C;

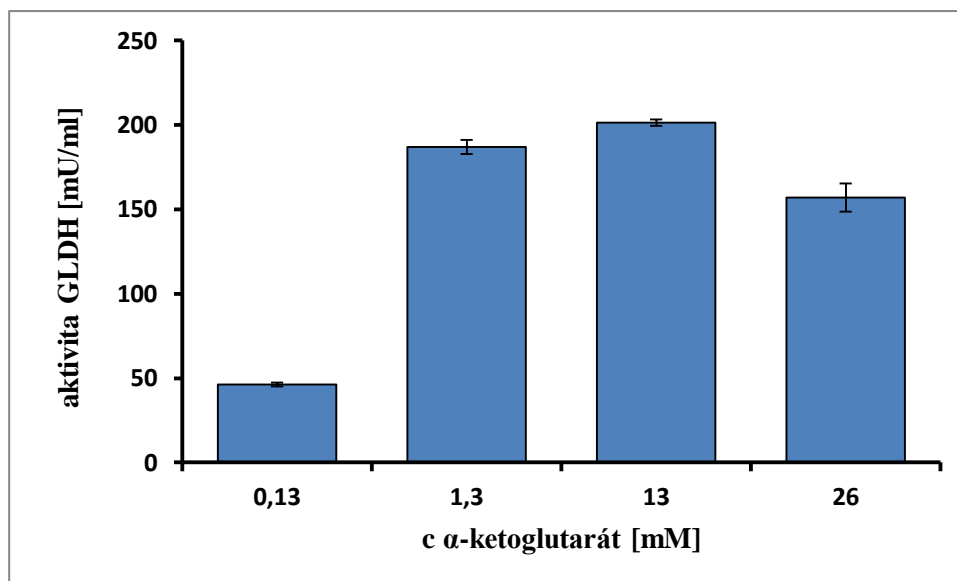
5.2 Optimalizace koncentrace α -ketoglutarátu

Během optimalizace jsme zjišťovali vhodnou koncentraci α -ketoglutarátu pro stanovení glutamátdehydrogenázové aktivity při použití 2 odlišných pufrů: sodno-fosfátového a triethanolaminového. Koncentraci α -KG, která je optimální, jsme určili podle hodnot aktivity glutamátdehydrogenázy. Použili jsme koncentrace v rozmezí 0,13 - 26 mM α -KG. Z grafu 5 je zřejmé, že nejvyšší aktivita GLDH je

u 1,3 mM α -KG při použití triethanolaminového pufru. Linearitu stanovení během celé doby měření bylo dosaženo v přítomnosti všech koncentrací α -KG. Při porovnání hodnot aktivit GLDH u obou použitých pufrů (graf 5 a 6) zjistíme, že aktivita GLDH v přítomnosti triethanolaminového pufru je ve všech případech výrazně nižší než při použití sodno-fosfátového pufru. V přítomnosti triethanolaminového pufru je aktivita GLDH u koncentrací 26 mM a 13 mM α -KG o 95 – 98 % nižší než při použití sodno-fosfátového pufru, v případě 0,13 mM α -KG se výrazný rozdíl mezi glutamátdehydrogenázovou aktivitou zmenšuje a činí 30 %. Za optimální koncentraci jsme zvolili hodnotu 13 mM α -KG, protože při použití této koncentrace byla aktivita GLDH v prostředí sodno-fosfátového pufru nejvyšší. Podrobné hodnoty aktivit GLDH jsou zaznamenány v příloze 3 a 4.



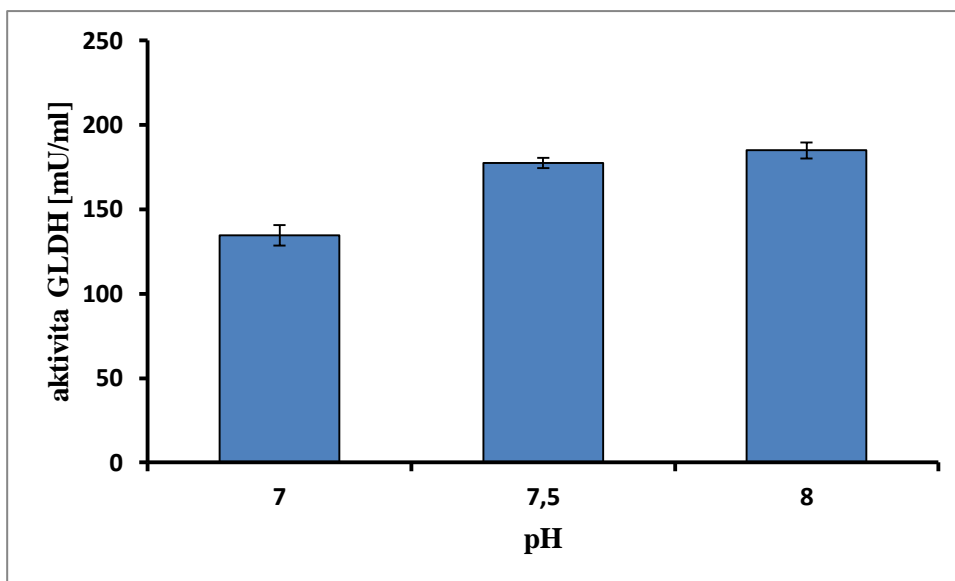
Graf 5: Vliv koncentrace α -KG na aktivitu GLDH při použití triethanolaminového pufru.
Podmínky stanovení: GLDH; 0,1 M TEA; 0,06 mM NADH; 25 mM EDTA; 3,2 M NH_4Ac ;
25 °C; průměr \pm SD; n = 3.



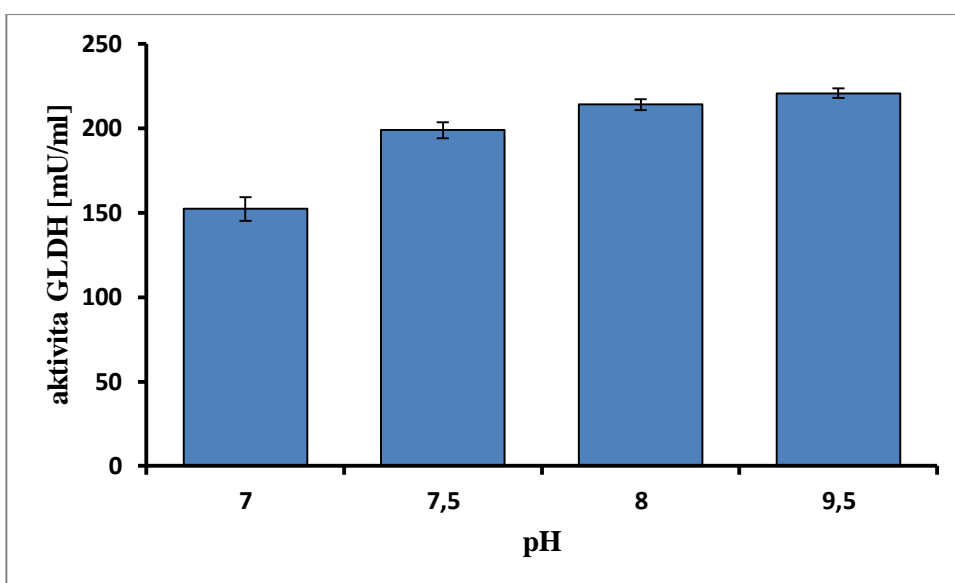
Graf 6: Vliv koncentrace α -KG na aktivitu GLDH při použití sodno-fosfátového pufru. Podmínky stanovení: GLDH; 0,1 M PB; 0,2 mM NADH; 2,5 mM EDTA; 3 M NH_4Cl ; 25 °C; průměr \pm SD; n = 3.

5.3 Optimalizace pH

Úkolem bylo ověřit vliv pH na stanovení aktivity glutamátdehydrogenázy. Ke stanovení jsme použili sodno-fosfátový pufr v rozmezí pH 7 – 8 a draselno-fosfátový pufr v rozmezí pH 7 - 9,5. Z grafů 7 a 8 je patrné, že nejvyšší hodnoty aktivity GLDH dosáhla v přítomnosti draselno-fosfátového pufru o pH 9,5. Při použití sodno-fosfátového pufru byla glutamátdehydrogenázová aktivita vždy nižší než při použití draselno-fosfátového pufru o stejném pH, v případě pH 7,5 se aktivita lišila o 11 % a v přítomnosti pH 8 se lišila o 14 %. Na základě všech předešlých výsledků jsme se rozhodli pro používání draselno-fosfátového pufru. Jako optimální hodnotu pH jsme zvolili 7,5, protože při tomto pH se enzymové aktivity stanovují nejčastěji. Aktivita GLDH analyzovaná při pH 7,5 se nelišila o více než 10 % v porovnání s aktivitou měřenou v přítomnosti pH 9,5. Při porovnání pH 9,5 a pH 7 u draselno-fosfátového pufru došlo k poklesu aktivity o 31 %. Podrobné hodnoty aktivit GLDH týkající se těchto pokusů jsou uvedené v příloze 5 a 6.



Graf 7: Vliv pH na aktivitu GLDH při použití sodno-fosfátového pufru. *Podmínky stanovení: GLDH; 0,1 M PB; 0,2 mM NADH; 13 mM α -KG; 2,5 mM EDTA; 3 M NH_4Cl ; 25 °C; průměr \pm SD; n = 3.*



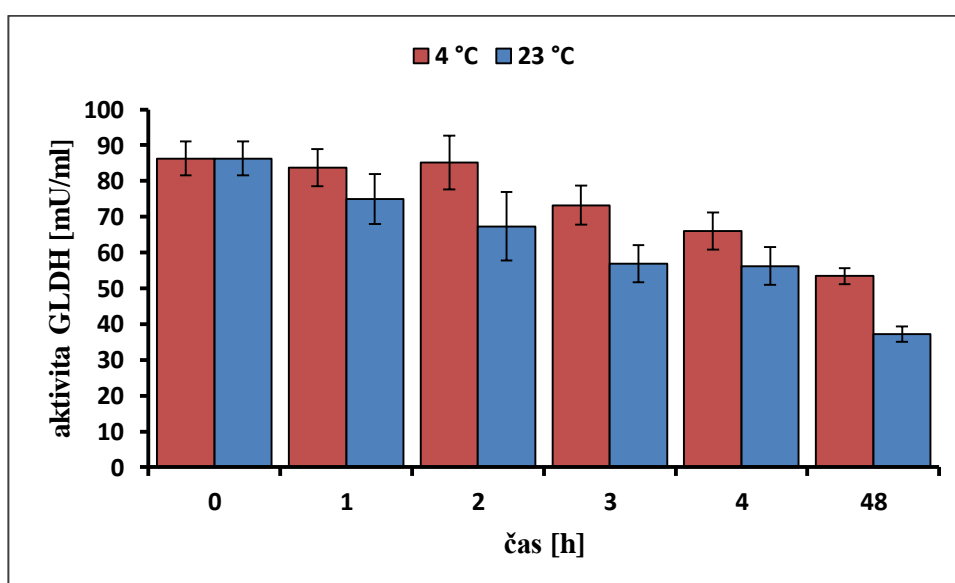
Graf 8: Vliv pH na aktivitu GLDH při použití draselno-fosfátového pufru. *Podmínky stanovení: GLDH; 0,1 M KP; 0,2 mM NADH; 13 mM α -KG; 2,5 mM EDTA; 3 M NH_4Cl ; 25 °C; průměr \pm SD; n = 3.*

5.4 Testování stability glutamátdehydrogenázy

5.4.1 Testování teplotní stability glutamátdehydrogenázy

Zjišťovali jsme aktivitu glutamátdehydrogenázy v závislosti na jejím uchování při různé teplotě. Pracovní roztok enzymu GLDH jsme skladovali

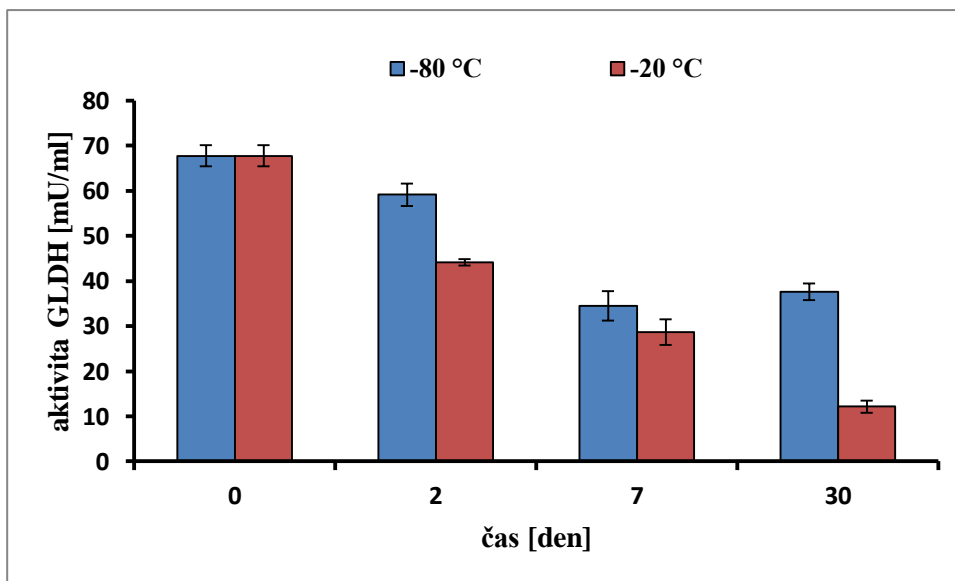
při teplotě 4 °C a při laboratorní teplotě 23 °C. Z výsledků (graf 9) je patrné, že GLDH uchovávaná při 4 °C je stabilnější. Výraznější pokles aktivity je vidět po 3 hodinách skladování enzymu při této teplotě. Pokles aktivity enzymu, který byl uchováván při pokojové teplotě 23 °C, je mnohem znatelnější. Již během 1. hodiny aktivita poklesla o 13 %, u enzymu skladovaném při 4 °C pouze o 3 %. Porovnáním glutamátdehydrogenázové aktivity stanovené po 48 hodinách a na začátku pokusu zjistíme, že aktivita enzymu skladovaného při teplotě 4 °C poklesla o 38 % a u enzymu skladovaného při pokojové teplotě klesla o 57 %. Jednotlivé hodnoty aktivit GLDH jsou zaznamenány v příloze 7 a 8.



Graf 9: Vliv teploty na stabilitu GLDH. *Podmínky stanovení: GLDH; 0,1 M KP; 0,2 mM NADH; 13 mM α -KG; 2,5 mM EDTA; 3 M NH_4Cl ; 25 °C; průměr \pm SD; n = 3.*

5.4.2 Testování stability glutamátdehydrogenázy při skladování

Cílem pokusu bylo zjistit vliv skladování glutamátdehydrogenázy na její stabilitu. GLDH jsme uchovávali zamraženou při -20 °C a -80 °C až po dobu 1 měsíc. Graf 10 ukazuje, že s časem klesá hodnota aktivity GLDH u obou způsobů skladování. Při skladování enzymu při -80 °C poklesla aktivita po 48 hodinách o 13 %, přičemž aktivita GLDH skladované při -20 °C poklesla o 35 %. Skladováním enzymu při -80 °C klesla glutamátdehydrogenázová aktivita po 1 měsíci o 45 %, při -20 °C o 82 %. Z našich výsledků tedy vyplývá, že GLDH uchovávaná při -80 °C má vyšší stabilitu. Podrobné hodnoty aktivit GLDH jsou uvedené v příloze 9 a 10.



Graf 10: Vliv skladování na stabilitu GLDH. Podmínky stanovení: GLDH; 0,1 M KP; 0,2 mM NADH; 13 mM α -KG; 2,5 mM EDTA; 3 M NH_4Cl ; 25 °C; průměr \pm SD; n = 3.

5.5 Stanovení aktivity glutamátdehydrogenázy v biologickém materiálu

5.5.1 Stanovení aktivity GLDH ve vzorcích sér potkanů

Optimalizovanou metodou jsme stanovili aktivity GLDH ve vzorcích potkaních sér (tab. X). Hodnoty aktivit enzymů (GLDH, AST, ALT a ALP) u jednotlivých potkanů jsou uvedeny v příloze 11.

Tab. X: Popis skupin potkanů

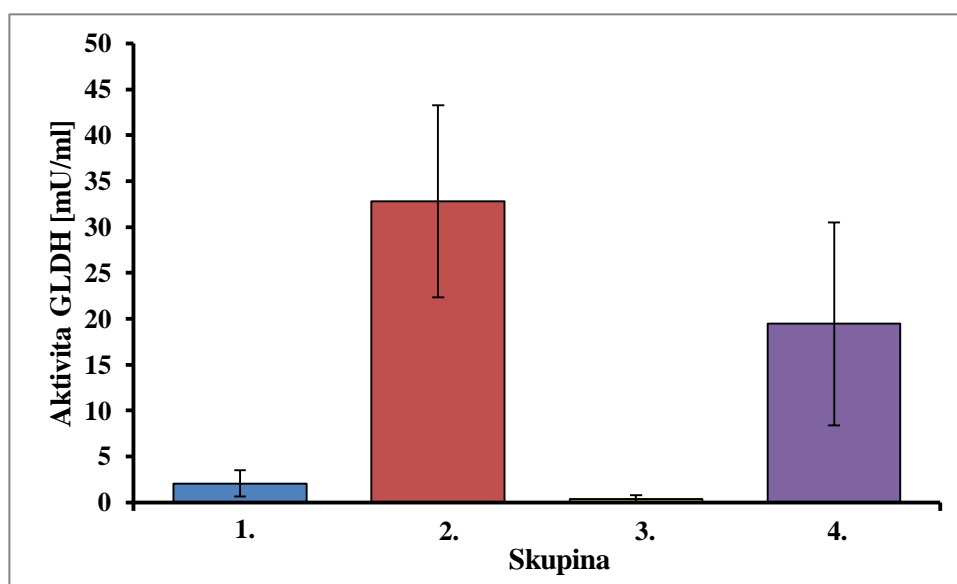
	Acetaminofen - dávka	Operační zákrok	Doba usmrcení
Skupina 1	4x 50 mg APAP/100 g	laparotomie	24 hod.
Skupina 2	4x 50 mg APAP/100 g	parciální hepatektomie	24 hod.
Skupina 3	4x 50 mg APAP/100 g	laparotomie	48 hod.
Skupina 4	4x 50 mg APAP/100 g	parciální hepatektomie	48 hod.

Naměřené aktivity GLDH ve vzorcích sér potkanů jsme porovnávali s aktivitami ostatních enzymů (AST, ALT a ALP) stanovených ve stejných vzorcích sér, které byly analyzovány na Oddělení klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové (tab. XI). Fyziologická hodnota aktivity GLDH se dle našich pokusů pohybuje v séru potkanů v rozmezí 0 – 2,2 mU/ml. Aktivity GLDH stanovené u sér kontrolní skupiny 1, kde byli potkani vystaveni účinkům acetaminofenu, následně podrobeni laparotomii a po 24 hodinách od operačního zásahu jim byla odebrána krev, odpovídaly

fyziologickým hodnotám, a tudíž nedošlo ke zvýšení jejich hladin. Stejný průběh byl zaznamenán i u laparotomovaných potkanů, kterým byla odebrána krev po 48 hodinách od operačního zákroku (skupina 3). Při porovnání aktivity GLDH vzorků sér skupiny 2 a kontrolních vzorků sér skupiny 1 zjistíme, že po parciální hepatektomii došlo k výraznému nárůstu aktivity GLDH. Aktivita GLDH se zvýšila v průměru o 30 mU/ml, tedy 16x v porovnání s kontrolními vzorky. Porovnáním průměrných aktivit GLDH stanovených u 3. a 4. skupiny potkanů zjistíme, že aktivita vzrostla 54x, přičemž aktivita v séru potkanů, které bylo odebráno 48 hodin po parciální hepatektomii, poklesla o 41 % v porovnání s aktivitou stanovenou 24 hodin od stejného operačního zákroku (graf 11).

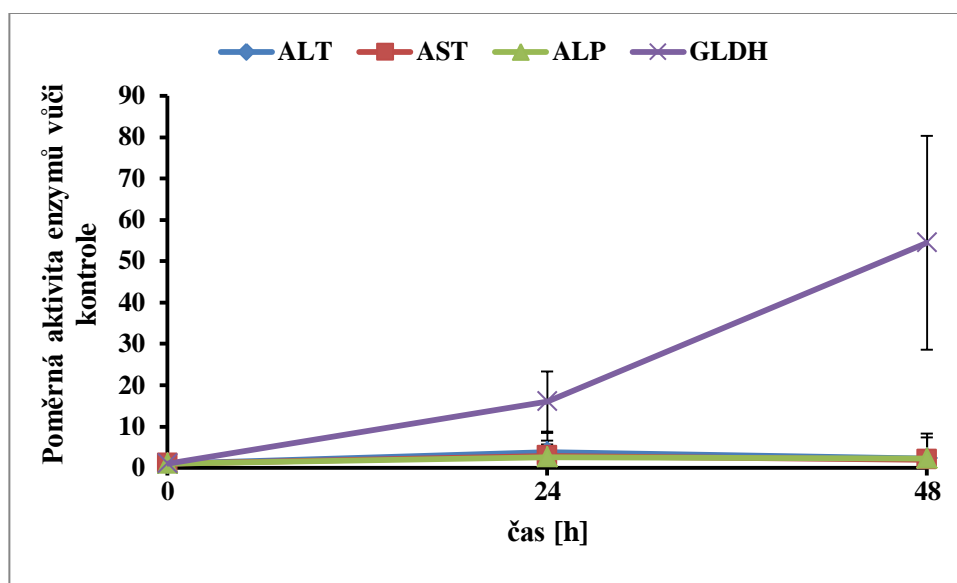
Tab. XI: Průměrné hodnoty aktivit enzymů po intoxikaci acetaminofenem, n = 5 - 6

skupina	ALT [mU/ml]	AST [mU/ml]	ALP [mU/ml]	GLDH [mU/ml]
1	49,6 ± 16,5	155,4 ± 16,3	125,2 ± 18,4	2,1 ± 1,4
2	188,5 ± 45,7	445,4 ± 91,2	314,0 ± 59,2	32,8 ± 10,4
3	40,3 ± 4,6	106,4 ± 8,5	115,2 ± 28,9	0,4 ± 0,4
4	93,0 ± 27	204,3 ± 46,2	255,3 ± 39,9	19,5 ± 11,1

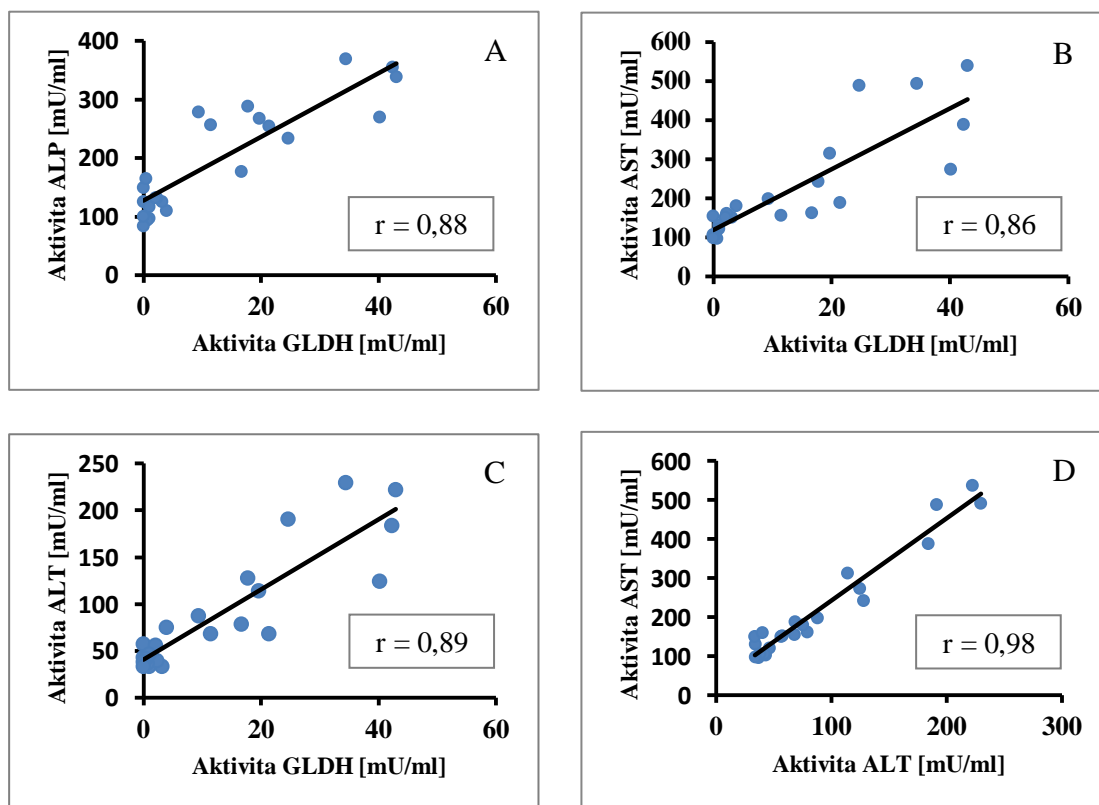


Graf 11: Aktivita GLDH v séru potkanů. Podmínky stanovení: 0,1 M KP; 0,2 mM NADH; 13 mM α -KG; 2,5 mM EDTA; 3 M NH_4Cl ; 25 °C; průměr ± SD; n = 5 - 6.

Při porovnání aktivit jednotlivých enzymů (AST, ALT, ALP, GLDH) skupiny potkanů 1 a 2 zjistíme, že u všech enzymů došlo po 24 hodinách od operačního zásahu k vzestupu aktivit (tab. XI). Nejvyšší nárůst aktivity byl zaznamenán u GLDH, kde aktivita vzrostla mnohonásobně více než u ostatních enzymů, neboť aktivita GLDH se zvýšila 16x vůči kontrolám (graf 12). U ALT došlo k čtyřnásobnému vzestupu aktivity, u AST a ALP vzrostla aktivita 3x. Po 48 hodinách od parciální hepatektomie došlo u většiny enzymů k poklesu jejich aktivit, avšak aktivita GLDH přetrvávala stále vysoká. Hodnoty všech korelačních koeficientů jsou vysoké, což značí, že aktivita GLDH v séru velice dobře koreluje s aktivitami ostatních enzymů (graf 13). Nejvyšší korelace bylo dle očekávání dosaženo mezi ALT a AST ($r = 0,98$). Korelace aktivity GLDH s ostatními enzymy je ale také velmi vysoká a pohybuje se mezi $r = 0,86 - 0,89$. Z výsledných aktivit GLDH a ze srovnání aktivit ostatních enzymů akutního poškození jater je patrné, že glutamátdehydrogenáza je významný marker tohoto druhu poškození.



Graf 12: Zvýšení aktivity enzymových markerů hepatotoxicity v porovnání s kontrolami; hodnoty uvedené pro časový interval 24 h byly vypočteny jako poměr průměrné aktivity daného enzymu skupiny 2 vs. 1 \pm SD; pro časový interval 48 h byly vypočteny jako poměr průměrné aktivity daného enzymu skupiny 4 vs. 3 \pm SD; n = 5 - 6.



Graf 13: (A) - korelace aktivity GLDH v séru potkanů s ALP (n = 23); (B) - korelace aktivity GLDH v séru potkanů s AST (n = 23) ; (C) - korelace aktivity GLDH v séru potkanů s ALT (n = 23); (D) - korelace aktivity ALT v séru potkanů s AST (n = 23)

6. Diskuze

Glutamátdehydrogenáza je enzym patřící do skupiny oxidoreduktáz. Vyskytuje se zejména v matrix mitochondrií jaterních buněk, ale nalezneme ji i v nervové, testikulární a mnoha dalších tkáních. Její funkce spočívá v metabolismu dusíku, kde katalyzuje reverzibilní oxidační deaminaci glutamátu, při které vzniká α -ketoglutarát a volný amoniak, jenž je následně odbouráván. Glutamátdehydrogenáza může využít jako redoxní koenzym NAD^+ i NADP^+ . Nezastupitelnou roli má i v udržování energetické homeostázy organismu. Skládá se ze 6 stejných podjednotek a rozlišují se 2 formy GLDH. Při poškození jaterní tkáně dochází k uvolnění glutamátdehydrogenázy a nárůstu její aktivity v krvi. Tento enzym je díky vysoké specifitě a senzitivitě považován za významný biomarker hepatotoxicity, který spolu s ostatními jaterními enzymy slouží k jednodušší diferenciaci jaterního onemocnění. I přes tato tvrzení vyšetření glutamátdehydrogenázy stále nepatří mezi běžně používané jaterní testy.

Cílem diplomové práce bylo optimalizovat podmínky stanovení glutamátdehydrogenázy. Nejčastěji používanou metodou analýzy GLDH je spektrofotometrická, při níž je detekován pokles absorbance za minutu při vlnové délce 340 nm. Pokles absorbance je způsobený oxidací NADH a je přímo úměrný aktivitě GLDH. Hodnota aktivity GLDH je vypočtena podle Lambert-Beerova zákona: $A = \varepsilon \cdot c \cdot l$ (A = absorbance; ε = molární extinkční koeficient, který pro NADH při 340 nm činí $622 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$; c = molární koncentrace; l = délka absorbující vrstvy, pro objem $310 \mu\text{l}$ činí $0,00905 \text{ m}$). Aktivita enzymu je vyjádřena v jednotkách mU/ml, kdy 1 U enzymové aktivity je množství enzymu, které katalyzuje přeměnu $1 \mu\text{mol}$ NADH za minutu. Ke stanovení aktivity GLDH jsme používali spektrofotometrickou čtečku Tecan Infinite M200.

Při optimalizaci podmínek analýzy GLDH jsme nejprve testovali koncentrace NADH. Ke stanovení jsme použili 2 odlišné pufrů a koncentrace v rozmezí $0,06 - 0,51 \text{ mM}$ NADH. V přítomnosti triethanolaminového pufru jsme naměřili nejvyšší aktivitu za použití $0,51 \text{ mM}$ NADH, při této koncentraci byla aktivita nejvyšší i v přítomnosti sodno-fosfátového pufru, aktivita byla ale o 30 % vyšší v porovnání s triethanolaminovým pufrům. Při použití obou pufrů platilo, že se vzrůstající

koncentrací NADH se zvyšovala i aktivita GLDH. Pokles absorbance byl lineární během celé doby analýzy u všech použitých koncentrací. Z ekonomických důvodů jsme zvolili jako optimální koncentraci 0,2 mM NADH, tuto hodnotu jsme určili jako průměr koncentrací 0,26 mM a 0,13 mM NADH. V publikaci Kawakami et al. (2010) použili pro zjištění optimální koncentrace NADH rozmezí koncentrací 0,015 - 0,21 mM NADH. Jako optimální byla vyhodnocena 0,15 mM NADH, i když nejvyšší aktivita GLDH byla naměřena v rozmezí koncentrací 0,15 – 0,2 mM NADH (Kawakami et al., 2010). Námi zvolená optimální koncentrace NADH se také nachází ve zmíněném rozmezí hodnot, ostatně i v publikacích dalších autorů nalezneme shodné koncentrace NADH (McCarthy et al., 1980; DeLuna et al., 2001).

V dalším kroku jsme optimalizovali koncentraci α -ketoglutarátu v přítomnosti 2 odlišných pufrů. Testovali jsme koncentrace v rozmezí 0,13 – 26 mM α -KG. Nejvyšší aktivita GLDH v přítomnosti triethanolaminového pufru byla při použití 1,3 mM α -KG a to o 50 % vyšší než u 0,13 mM α -KG. Aktivity GLDH nalezené při použití vyšších koncentrací α -KG (13 mM a 26 mM) byly velmi nízké. V přítomnosti sodno-fosfátového pufru došlo k výrazným nárůstům aktivit GLDH. Při testování 13 mM a 1,3 mM α -KG se aktivity GLDH lišily pouze o 7 %, přičemž v přítomnosti triethanolaminového pufru byl rozdíl 94 %. V práci Kawakami et al. (2010) stanovili nejvyšší aktivitu GLDH v přítomnosti 36 mM α -KG při pH draselno-fosfátového pufru 6,5. Naproti tomu, v publikaci McCarthy et al. (1980) autoři uvádějí, že optimální koncentrace α -KG pro stanovení aktivity GLDH je 5 mM α -KG při použití sodno/draselno-fosfátového pufru o pH 7,4. My jsme jako optimální koncentraci substrátu pro stanovení glutamátdehydrogenázové aktivity vybrali 13 mM α -KG, a to proto, že aktivita GLDH v přítomnosti sodno-fosfátového pufru byla při použití této koncentrace nejvyšší.

V procesu optimalizace stanovení GLDH jsme použili několik pufrů – triethanolaminový, sodno-fosfátový a draselno-fosfátový. Použití triethanolaminového pufru pro stanovení GLDH jsme vyhodnotili jako méně vhodné, i když se s jeho používáním setkáváme v odborné literatuře, např. v práci Jung et al. (1985), Hussain et al. (1989) a také u komerčních kitů firem Sigma a Roche Diagnostics. Již z procesu optimalizace koncentrací NADH a α -ketoglutarátu je patrné, že aktivita GLDH za použití triethanolaminového pufru je nižší než v přítomnosti sodno-fosfátového pufru. pH triethanolaminového pufru se v průběhu reakce pravděpodobně mění, tento

pufr málo pufruje koncentraci H^+ iontů a toto ovlivňuje vlastní stanovení. Optimálním pufr pro stanovení aktivity GLDH jsme zvolili draselno-fosfátový pufr a to z několika následujících důvodů. Tento pufr je blízký vnitřnímu prostředí mitochondrie, kde se nachází glutamátdehydrogenáza, v jeho přítomnosti je dosaženo linearitativy stanovení během celé analýzy a vypočtená aktivita je vyšší než při použití ostatních pufrů (triethanolaminového a sodno-fosfátového pufru). Kawakami et al. (2010) použili pro stanovení glutamátdehydrogenázové aktivity taktéž draselno-fosfátový pufr, ale o pH 6,5, a v práci McCarthy et al. (1980) byl použit sodno/draselno-fosfátový pufr pH 7,4. Měřením pH během průběhu reakce jsme navíc zjistili, že v přítomnosti draselno-fosfátového pufru se pH během reakce téměř nemění.

Nakonec jsme také zjišťovali, jaké pH bude pro stanovení GLDH ideální. Udávané optimální pH pro přímou reduktivní aminaci α -ketoglutarátu je okolo 8 (Lee et al., 1999). V přímé glutamátové oxidaci je optimální pro stanovení aktivity GLDH používat pH v rozmezí 7,4 – 8 (McCarthy et al., 1980; Hussain et al., 1989). Avšak v práci Lee et al. (1999) byla optimální aktivita GLDH v přímé glutamátové oxidaci detekována v rozmezí hodnot pH 9,0 – 9,5. Aktivita GLDH činila v takovýchto podmínkách dvojnásobek hodnoty aktivity než v přítomnosti pH 7,5 – 8. I přes tuto skutečnost, ve většině publikací (McCarthy et al., 1980; Bailey et al., 1982; Jung et al., 1985; Ozretić et Krajnović-Ozretić, 1993) můžeme nalézt hodnotu pH v rozmezí 7,4 – 8. Námí stanovená aktivita GLDH v přítomnosti draselno-fosfátového pufru o pH 9,5 se lišila od hodnoty analyzované při pH 7,5 pouze o 10 %. Pro další stanovení GLDH jsme se proto rozhodli používat pH 7,5. Pozadí způsobené nespecifickým signálem činilo u pH 7,5 pouze 3 % celkové aktivity. Naproti tomu, s klesajícím pH toto procento výrazně roste. Kromě pH jsme také zjišťovali teplotu stanovení GLDH, 25 °C bylo vyhodnoceno jako optimální.

Během optimalizace jsme testovali, za jakých podmínek je nejvhodnější glutamátdehydrogenázu skladovat. Enzym jsme uchovávali při pokojové teplotě 23 °C a v lednici při 4 °C. Z výsledků je patrné, že aktivita GLDH skladované při 4 °C je vždy vyšší než aktivita enzymu skladovaného při pokojové teplotě. Skladováním enzymu při pokojové teplotě dochází k poklesu aktivity již během 2 hodin, aktivita enzymu klesla po 2 hodinách od začátku detekce o 22 %, zatímco u enzymu skladovaného při 4 °C byl pokles aktivity pouze o 1,3 %. Aktivita enzymu uchovávaného při 4 °C činila po 48 hodinách 62 % původní hodnoty, přičemž u enzymu skladovaného při pokojové

teplotě byla aktivita 43 % oproti původní aktivitě. Enzym jsme také uchovávali zamražený při různé teplotě. Po týdnu skladování GLDH při -20 °C a -80 °C klesla aktivita GLDH zhruba o 50 % v obou případech. Avšak po 1 měsíci již byl patrný rozdíl, aktivita enzymu uchovávaného při -20 °C činila pouze 18 % původní hodnoty, oproti tomu aktivita GLDH skladované při -80 °C 55 %. Z naměřených výsledků teplotních podmínek skladování glutamátdehydrogenázy vyplývá, že je vhodné připravovat standardy glutamátdehydrogenázy vždy čerstvé. Vzorky je nutné co nejrychleji zpracovat, optimálně do 2 hodin od odebrání, či je zmrazit při -80 °C.

Glutamátdehydrogenáza je enzym, jehož aktivita v séru roste rychle po akutním poškození jater. K vysokému vzestupu aktivity dochází především při nekróze jaterních buněk. Je právem považována za klinický biomarker hepatotoxicity, její specifita pro jaterní tkáň je vyšší než u aminotransferáz a aktivita v séru není ovlivňována poškozením kosterní svaloviny jako u některých enzymů (O'Brien et al., 2002; Giffen et al., 2003).

Za předem optimalizovaných podmínek jsme stanovovali aktivitu glutamátdehydrogenázy v séru potkanů, kterým byl aplikován acetaminofen a těmto potkanům byly navíc odebrány 2/3 jater. Acetaminofen je účinné analgetikum a antipyretikum, jenž patří mezi xenobiotika detoxikovaná pomocí glutathionu (Halmes et al., 1996). Za běžných okolností není toxický, při předávkování dochází k vyčerpání zásob glutathionu v játrech, zvýšení oxidačního stresu a poškození buněk, zejména hepatocytů (Jaeschke et Bajt, 2006). Acetaminofen je často používán jako modelový toxin pro navození toxického poškození jaterních buněk. Stanovením aktivity GLDH v séru potkanů a vyhodnocením získaných výsledků spolu s aktivitami enzymů AST, ALT a ALP jsme zjistili, že u všech enzymů dochází k vzestupu jejich aktivit po dávce acetaminofenu a následné parciální hepatektomii. K nejmenšímu nárůstu aktivit došlo po 24 hodinách od parciální hepatektomie u AST a ALP v porovnání s kontrolními vzorky, hodnoty aktivit vzrostly 3x, u ALT 4x. Aktivita GLDH se zvýšila 16x. Oproti tomu, u kontrolních zvířat, která prodělala pouze laparotomii a byla také podrobena účinkům acetaminofenu, k žádnému vzestupu aktivity glutamátdehydrogenázy nedošlo. Vyhodnocením dat naměřených po 48 hodinách od operačního zákroku jsme zjistili, že aktivity všech enzymů jsou v porovnání s aktivitami naměřenými po 24 hodinách nižší. Aktivita AST a ALT se začala vracet k původním hodnotám nejrychleji, aktivita ALP

a GLDH zůstávala stále na vysokých hodnotách. Aktivita GLDH byla po 48 hodinách v porovnání s kontrolními vzorky zvýšená 54x, zatímco aktivity ostatních enzymů klesly cca o polovinu. Obdobný trend je popsán i v článku O'Brien et al. (2000), kde jako toxin použili také acetaminofen a aktivity AST, ALT a ALP vzrostly o 50 %, ale glutamátdehydrogenázová aktivita vzrostla 23x v porovnání s kontrolami. Avšak, na rozdíl od našich výsledků, byl v této publikaci po 48 hodinách znatelný pokles poměrné aktivity GLDH vůči kontrolní skupině (O'Brien et al., 2002). Při porovnání korelačních koeficientů zjistíme, že GLDH stanovená v séru velice dobře koreluje se všemi zmíněnými enzymy jaterního poškození (AST, ALT a ALP), korelační koeficient ALT/AST dosahuje hodnoty 0,98, koeficienty korelace GLDH s ostatními enzymy se přibližují hodnotě 0,90. Ze všech hodnot korelace vyplývá vzájemný vztah mezi jednotlivými enzymy. V práci O'Brien et al. (2002) nalezneme korelační koeficient GLDH/ALT roven 0,86 a GLDH/AST roven 0,84, avšak u korelace GLDH/ALP je mnohem nižší $r = 0,67$ (O'Brien et al., 2002). Vzestup aktivit enzymových markerů nalezneme i v publikacích dalších autorů, např. v práci Kravos et Malešič (2010) došlo k vzestupu AST, ALT a GLDH v závislosti na působení toxinu, ve studii Ozretić et Krajnović-Ozretić (1993) můžeme nalézt zvýšené hladiny enzymů GLDH a ALP účinkem tetrachlormetanu a fenolu, aktivita GLDH se zvýšila až 27x oproti původním hodnotám.

Porovnáním enzymů – AST, ALT, ALP a GLDH jsme potvrdili, že jsou všechny vhodnými biomarkery toxického poškození jater, avšak glutamátdehydrogenáza vykazovala nejvyšší senzitivitu, a proto by její použití nemělo být opomíjeno. GLDH je významným markerem hepatotoxicity, jak z důvodu výrazného vzestupu její aktivity, tak i prodloužené doby přetrvávání v krvi po poškození. Naproti tomu, použitím kombinací biochemických markerů hepatotoxicity docílíme přesnější a rychlejší diagnózy poškození jater.

7. Závěr

Za účelem stanovení aktivity glutamátdehydrogenázy byla optimalizována spektrofotometrická metoda. Jako optimální podmínky stanovení glutamátdehydrogenázové aktivity byly určeny 0,1 M draselno-fosfátový pufr, 0,2 mM NADH a 13 mM α -ketoglutarát. Bylo zjištěno, že v přítomnosti draselno-fosfátového pufru pH 7,5 je aktivita GLDH dostatečně vysoká a pozadí nespecifického signálu tvoří zanedbatelnou část celkové aktivity. Bylo prokázáno, že skladování glutamátdehydrogenázy při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ je optimální, proto je vhodné vzorky co nejrychleji zpracovat či je zmrazit při této velmi nízké teplotě.

Optimalizovanou metodou byly detekovány aktivity GLDH ve vzorcích sér potkanů, stanovené hodnoty aktivit byly porovnány s aktivitami ostatních enzymů – AST, ALT a ALP. Bylo zjištěno, že po toxickém působení acetaminofenu na jaterní tkáň dochází k výraznému nárůstu aktivity GLDH v séru, která velice dobře koreluje s aktivitami porovnávaných enzymů.

Glutamátdehydrogenáza byla vyhodnocena jako vhodný marker hepatotoxicity, její stanovení je užitečné pro včasné odhalení poškození jater a také v kombinaci s dalšími markery pro snadnější rozpoznání druhu a rozsáhlosti jaterního onemocnění.

8. Seznam literatury

1. AHMED N.: *Clinical biochemistry*. Oxford University Press, **2011**, p. 205, 618, 659.
2. BAHI-BUISSON N.; ROZE E.; DIONASI C.; ESCANDE F. et al.: *Neurological aspects of hyperinsulinism-hyperammonaemia syndrome*. *Developmental Medicine & Child Neurology*, **2008**, 50, p. 945-949.
3. BAILEY J.; BELL E.T.; BELL J.E.: *Regulation of bovine glutamate dehydrogenase*. *The Journal of Biological Chemistry*, **1982**, 257, p. 5579-5583.
4. BAKER P.J.; WAUGH M.L.; WANG G.X.; STILLMAN J.T. et al.: *Determinants substrate specificity in the superfamily of amino acid dehydrogenases*. *Biochemistry*, **1997**, 36(51), p. 16109-16115.
5. BALASUBRAMANIAM S.; KAPOOR R.; YEOW J.H.; LIM P.G. et al.: *Biochemical evaluation of an infant with hypoglycemia resulting from a novel de novo mutation of the GLUD1 gene and hyperinsulinism-hyperammonemia syndrome*. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism*, **2011**, 24, p. 573-577. Abstrakt.
6. BANERJEE S.; SCHMIDT T.; FANG J.; STANLEY A.C.; SMITH T.: *Structural studies on ADP activation of mammalian glutamate dehydrogenase and the evolution of regulation*. *Biochemistry*, **2003**, 42, p. 3446-3456.
7. BERNARDI P.; PETRONILLI V.; DI LISA F.; FORTE M.: *A mitochondrial perspective on cell death*. *Trends in biochemical sciences*, **2001**, 26/2, p. 112-117.
8. BERTRAM G.K.: *Základní a klinická farmakologie*. Nakladatelství H & H, **2006**, 2.vydání, p. 585-586.
9. BLUMENTHAL K.M.; SMITH E.L.: *Alternative substrates for glutamate dehydrogenases*. *Biochemical and biophysical research communications*, **1975**, 62/1, p. 78-84.
10. CONIGRAVE M.K.; DAVIES P.; HABER P.; WHITFIELD B.J.: *Traditional markers of excessive alcohol use*. *Addiction*, **2003**, 98/2, p. 31-43.
11. ČIHÁK R.: *Anatomie 2*. Grada, **2002**, p. 127-135.

12. DELOUKAS P.; DAUWERSE J.G.; MOSCHONAS N.K.; OMMEN G.J.B.; SOON A.P.G.M.: *Three human glutamate dehydrogenase genes (GLUD1, GLUDP2 and GLUDP3) are located on chromosome 10q, but are not closely physically linked.* Genomics, **1993**, 17, p. 676-681.
13. DELUNA A.; AVEDANO A.; RIEGO L.; GONZÁLEZ A.: *NADP – Glutamate dehydrogenase isoenzymes of Saccharomyces cerevisiae.* The Journal of Biological Chemistry, **2001**, 276/47, p. 43775-43783.
14. ELLIS G.; GOLDBERG D.M.: *Optimal conditions for the kinetic assay of serum glutamate dehydrogenase activity at 37°C.* Clinical Chemistry, **1972**, 18, p. 523-527.
15. FISHER H.F.: *L-glutamate dehydrogenase from bovine liver.* Methods in enzymology, **1985**, 113, p. 16-27.
16. FRY M.: *Essential Biochemistry for Medicine.* John Wiley & Sons, **2011**, p. 100.
17. FUTTER L.E.; AL-SWAYEH O.A.; MOORE P.K.: *A comparison of the effect of nitroparacetamol and paracetamol in liver injury.* British journal of pharmacology, **2001**, 132, p. 10-12.
18. GIFFEN P.S.; PICK C.R.; PRICE M.A.; WILLIAMS A.; YORK M.J.: *Alpha-Glutathione S-Transferase in the Assessment of hepatotoxicity - Its diagnostic utility in comparison with other recognized markers in the Wistar Han rat.* Toxicologic pathology, **2002**, 30/3, p. 365-372.
19. GODA S.; KOJIMA M.; NISHIKAWA Y.; KUJO C. et al.: *Intersubunit interaction induced by subunit rearrangement is essential for the catalytic activity of the hyperthermophilic glutamate dehydrogenase from Pyrobaculus islandicum.* Biochemistry, **2005**, 45, p. 15304-15313.
20. GOLDBERG M.: *Structural, functional, and clinical aspects of gamma-glutamyltransferase.* Critical reviews in clinical laboratory sciences, **1980**, 12/1, p. 1-58. Abstrakt.
21. HALMES N.C.; HINSON J.A.; MARTIN B.M.; PUMFORD N.R.: *Glutamate dehydrogenase covalently binds to a reactive metabolite of acetaminophen.* Chemical research in toxicology, **1996**, 9, p. 541-546.

22. HANNUKSELA M.L.; LIISANANTTI M.K.; NISSINEN A.E.; SAVOLAINEN M.J.: *Biochemical markers of alcoholism*. Clinical chemistry and laboratory medicine, **2007**, 45/8, p. 953-961.
23. HUSSAIN M.M.; ZANNIS V.I.; PLAITAKIS A.: *Characterization of glutamate dehydrogenase isoproteins purified from the cerebellum of normal subjects and patients with degenerative neurological disorders, and from human neoplastic cell lines*. The Journal of Biological Chemistry, **1989**, 264/34, p. 20730-20735.
24. CHANG C.Y.; SCHIANO T.D.: *Drug hepatotoxicity*. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, **2007**, 25, p. 1135-1151.
25. CHO S.W.; LEE J.; CHOI S.Y.: *Two soluble forms of glutamate dehydrogenase isoproteins from bovine brain*. European journal of biochemistry, **1995**, 233/1, p. 340-346.
26. JAESCHKE H.; BAJT M.L.: *Intracellular signaling Mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death*. Toxicological Sciences, **2006**, 89/1, p. 31-41.
27. JAESCHKE H.; GORES G.J.; CEDERBAUM A.I.; HINSON J.A. et al.: *Mechanisms of hepatotoxicity*. Toxicological sciences, **2002**, 65, p. 166-176.
28. JUNG K.; PERGANDE M.; REJ R.; SCHREIBER G.; SCHIMMELPFENNIG W.: *Mitochondrial enzymes in human serum: Comparative determinations of glutamate dehydrogenase and mitochondrial aspartate aminotransferase in healthy persons and patients with chronic liver diseases*. Clinical Chemistry, **1985**, 31/2, p. 239-243.
29. JUNQUEIRA L.C.; CARNEIRO J.: *Basis Histology, a text and atlas*. International Edition, **2010**, 12, p. 289.
30. KADIR A.F.; OTHMAN F.; ABDULLA M.A.; HUSSAN F.; HASSANDARVISH P.: *Effect of Tinospora crispa on thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats*. Indian journal of pharmacology, **2011**, 43/1, p. 64-68.
31. KAWAKAMI R.; OYAMA M.; SAKURABA H.; OHSHIMA T.: *The unique kinetic behavior of the very large NAD-dependent glutamate dehydrogenase from Janthinobacterium lividum*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, **2010**, 74, p. 884-887.

32. KOPÁČ J.: *Lékařská laboratorní diagnostika*. Polygraf, Lékařská laboratoř Trutnov, **2004**, p. 34-35, 75-76, 222.
33. KRAVOS M.; MALEŠIČ I.: *Glutamate dehydrogenase as a marker of alcohol dependence*. Alcohol & Alcoholism, **2010**, 45, p. 39-44.
34. KRAVOS M.; MALEŠIČ I.: *Kinetics and isoforms of serum glutamate dehydrogenase in alcoholics*. Alcohol & Alcoholism, **2008**, 43, p. 281-286.
35. KUČERA O.; LOTKOVÁ H.; KŘIVÁKOVÁ P.; ROUŠAR T.; ČERVINKOVÁ Z.: *Modelové systémy pro studium toxického poškození hepatocytů in vitro*. Československá fyziologie, **2006**, 55/3, p. 103-110.
36. LEDVINA M.; STOKLASOVÁ A.; CERMAN J.: *Biochemie pro studující medicíny I. díl*. Karolinum, **2009**, p. 224.
37. LEE J.W.; SHIN D.K.; LEE M.; KIM J.E. et al.: *Role of metabolism by flavin-containing monooxygenase in thioacetamide-induced immunosuppression*. Toxicology letters, **2003**, 136/3, p. 163-172.
38. LEE W.; SHIN S.; CHO S.S.; PARK J.S.: *Purification and Characterization of Glutamate Dehydrogenase as Another Isoprotein Binding to the Membrane of Rough Endoplasmatic Reticulum*. Journal of Cellular Biochemistry, **1999**, 76, p. 244-253.
39. LI M.; LI C.; ALLEN A.; STANLEY A.C.; SMITH J.T.: *The structure and allosteric regulation of glutamate dehydrogenase*. Neurochemistry International, **2011**, 59, p. 445-455.
40. LIMDI J.K.; HYDE G.M.: *Evaluation of abnormal liver function tests*. Postgraduate medical journal, **2003**, 79, p. 307-312.
41. LINCOVÁ D.; FARGHALI H.; ČEPELÍK J.; DĚDINA M. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. Galén, **2005**, p. 276-277.
42. MASTORODEMOS V.; ZAGANAS I.; SPANAKI C.; BESSA M.; PLAITAKIS A.: *Molecular basis of human glutamate dehydrogenase regulation under changing energy demands*. Journal of Neuroscience Research, **2005**, 79, p. 65-73.
43. MCCARTHY A.D.; WALKER J.M.; TIPTON K.F.: *Purification of glutamate dehydrogenase from ox brain and liver*. The Biochemical journal, **1980**, 191, p. 605-611.

44. MCGIVEN J.D.; CHAPPELL J.B.: *On the metabolit function of glutamate dehydrogenase in rat liver*. Febs Letters, **1975**, 52/1, p. 1-7.
45. MICHAELIDIS T.M.; TZIMAGIORGIS G.; MOSCHONAS N.K.; PAPAMATHEAKIS J.: *The human glutamate dehydrogenase gene family: gene organization and structural characterization*. Genomics, **1993**, 16, p. 150-160.
46. MIKI Y.; TAKI T. et al.: *Novel missence mutations in the glutamate dehydrogenase gene in the congenital hyperinsulinism-hyperammonemia syndrome*. Journal of Pediatrics, **2000**, 136, p. 69-72.
47. NAJMI A.K.; PILLAI K.K.; PAL S.N.; AKHTAR M. ET AL.: *Effect of l-ornithine l-aspartate against thioacetamide-induced hepatic damage in rats*. Indian journal of pharmacology, **2010**, 42/6, p. 384-387.
48. NAKASUKO M.; FUJISAWA T.; ADACHI S.; KUDO T.; HUGUCHI S.: *Large scale domain in movements and hydration structure changes in the active-site cleft of unligated glutamate dehydrogenase from Thermococcus profundus studies by cryogenic X-ray crystal structure analysis and small-angle X-ray scattering*. Biochemistry, **2001**, 40, p. 3069-3079.
49. O'BRIEN P.J.; SLAUGHTER M.R.; POLLEY S.R.; KRAMER K.: *Advantages of glutamate dehydrogenase as a blood biomarker of acute hepatic injury in rats*. Laboratory animals, **2002**, 36, p. 313-321.
50. O'BRIEN P.J.; SLAUGHTER M.R.; SWAIN A.; BIRMINGHAM J.M. et al.: *Repeated acetaminophen dosing in rats: adaptation of hepatic antioxidant systém*. Human and experimental toxicology, **2000**, 19, p. 277-283.
51. OZER J.; RATNER M.; SHAW M.; BAILEY W.; SCHOMAKER S.: *The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity*. Toxicology, **2008**, 245, p. 194-205.
52. OZRETIĆ B.; KRAJNOVIĆ-OZRETIĆ M.: *Plasma sorbitol dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, and alkaline phosphatase as potential indicators of liver intoxication in grey mullet (Mugil auratus Risso)*. Bulletin of environmental contamination and toxicology, **1993**, 50, p. 586-592.
53. PAJIČ T.; ČERNELČ P.; BRIŠKI S.A.; LEJKO-ZUPANC T.; MALEŠIČ I.: *Glutamate dehydrogenase aktivty in lymphocytes of B-cell chronic*

- lymphocytic leukaemia patients*. *Clinical Biochemistry*, **2009**, 42, p. 1677-1684.
54. PERLÍK F.: *Základy klinické farmakologie*. Galén, Praha, **2008**, p. 106.
55. PLAITAKIS A.; SPANAKI C.; MASTORODEMOS V.; ZAGANAS I.: *Study of structure - function relationships in human glutamate dehydrogenase reveals novel molecular mechanism for the regulation of the nerve tissue-specific (GLUD2) isoenzyme*. *Neurochemistry International*, **2003**, 43, p. 401-410.
56. RACEK J.; EISELT J.; FRIEDECKÝ B.; HOLEČEK V. et al.: *Klinická biochemie*. Galén, Praha, 2. vydání, **2006**, p. 81, 201.
57. ROUŠAR T.; PAŘÍK P.; KUČERA O.; BARTOŠ M.; ČERVINKOVÁ Z.: *Glutathione reductase is inhibited by acetaminophen-glutathione conjugate in vitro*. *Physiological research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, **2010**, 59/2, p. 225-232.
58. SANZ N.; DÍEZ-FERNÁNDEZ C.; ANDRÉS D.; CASCALES M.: *Hepatotoxicity and aging: endogenous antioxidant systems in hepatocytes from 2-, 6-, 12-, 18- and 30- month – old rats following a necrogenic dose of thioacetamide*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2002**, 1587, p. 12-20.
59. SCHMIDT E.S.; SCHMIDT F.W.: *Glutamate dehydrogenase: biochemical and clinical aspects of an interesting enzyme*. *Clinica Chimica Acta*, **1988**, 43, p. 43-56.
60. SMART R.C.; HODGSON E.; REED D.J.; WALLACE A.D.; Meyer S.A. et al.: *Molecular and biochemical toxicology*. John Wiley & Sons, **2008**, 4. vydání, p. 336-348.
61. SMITH T.J.; SCHMIDT T.; FANG J.; WU J. et al.: *The structure of apo human glutamate dehydrogenase details subunit communication and allostery*. *Journal of molecular biology*, **2002**, 318, p. 765-777.
62. STAŇKOVÁ P.; KUČERA O.; LOTKOVÁ H.; ROUŠAR T. et al.: *The toxic effect of thioacetamide on rat liver in vitro*. *Toxicology in vitro*, **2010**, 24, p. 2097-2103.
63. STANLEY C.A.; LIEU Y.K.; HSU Y.L.B.; BURLINA B.A. et al.: *Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations*

- of the glutamate dehydrogenase gene*. The New England Journal of Medicine, **1998**, 338, p. 1352-1357.
64. TURGET O.; TANDOĞAN I.: *Gamma-glutamyltransferase to determine cardiovascular risk: shifting the paradigm forward*. Journal of atherosclerosis and thrombosis, **2011**, 18/3, p. 177-181.
65. WEB; <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/mitochondria/mitochondria.html>;
citováno dne 26.3.2012
66. WOOD W.G.; SINGER J.; SCHMIDT-GAYK H.: *Establishment of reference intervals for enzyme catalytic activity concentration measurements at 37°C - a practical approach*. Clinical laboratory, **2004**, 50/7+8, p. 455-475.
67. WRIGHT T.M.; VANDENBERG A.M.: *Risperidone- and quetiapine- induced cholestasis*. The Annals of Pharmacotherapy, **2007**, 41, p. 1518-1523.
68. ZAGANAS I.; KANAVOURAS K.; MASTORODEMOS V.; LATSLOUDIS H.: *The human GLUD2 glutamate dehydrogenase: localization and functional aspects*. Neurochemistry International, **2009**, 55, p. 52-63.
69. ZAMMARCHI E.; FILIPPI L.; NOVEMBRE E.; DONATI A.M.: *Biochemical evolution of a patient with familial form of leucine - sensitive hypoglycemia and concomitant hyperammonemia*. Metabolism, **1996**, 45, p. 957-960.

9. Přílohy

Příloha 1: Vliv koncentrace NADH na aktivitu GLDH při použití sodno-fosfátového pufru (n = 3)

Koncentrace NADH [mM]	$\Delta A/\Delta t$ [min]	Aktivita GLDH \pm SD [mU/ml]
0,51	0,017	47,0 \pm 2,0
0,26	0,015	40,2 \pm 3,7
0,13	0,010	27,1 \pm 1,9
0,06	0,006	17,3 \pm 0,8

Příloha 2: Vliv koncentrace NADH na aktivitu GLDH při použití triethanolaminového pufru (n = 3)

Koncentrace NADH [mM]	$\Delta A/\Delta t$ [min]	Aktivita GLDH \pm SD [mU/ml]
0,51	0,010	28,6 \pm 0,4
0,26	0,009	24,6 \pm 0,3
0,13	0,007	20,1 \pm 2,4
0,06	0,004	11,7 \pm 2,0

Příloha 3: Vliv koncentrace α -KG na aktivitu GLDH při použití sodno-fosfátového pufru (n = 3)

Koncentrace α -KG [mM]	$\Delta A/\Delta t$ [min]	Aktivita GLDH \pm SD [mU/ml]
26,0	0,057	157,1 \pm 8,3
13,0	0,073	201,4 \pm 1,8
1,3	0,068	187,0 \pm 4,2
0,13	0,017	46,2 \pm 1,2

Příloha 4: Vliv koncentrace α -KG na aktivitu GLDH při použití triethanolaminového pufru (n = 3)

Koncentrace α -KG [mM]	$\Delta A/\Delta t$ [min]	Aktivita GLDH \pm SD [mU/ml]
26,0	0,003	7,2 \pm 0,4
13,0	0,001	3,9 \pm 0,3
1,3	0,023	63,0 \pm 2,3
0,13	0,012	32,0 \pm 2,2

Příloha 5: Vliv pH na aktivitu GLDH při použití sodno-fosfátového pufru (n = 3)

pH	$\Delta A/\Delta t$ [min]	Aktivita GLDH \pm SD [mU/ml]
7	0,048	134,6 \pm 6,1
7,5	0,064	177,4 \pm 3,1
8	0,067	184,9 \pm 4,8

Příloha 6: Vliv pH na aktivitu GLDH při použití draselno-fosfátového pufru (n = 3)

pH	$\Delta A/\Delta t$ [min]	Aktivita GLDH \pm SD [mU/ml]
7	0,056	152,3 \pm 7,0
7,5	0,071	199,0 \pm 4,8
8	0,077	214,2 \pm 3,2
9,5	0,081	220,8 \pm 2,9

Příloha 7: Vliv teploty na stabilitu GLDH uchovávanou při 4 °C (n = 3)

Doba uchování [h]	$\Delta A/\Delta t$ [min]	Aktivita GLDH \pm SD [mU/ml]
0	0,031	86,3 \pm 4,7
1	0,030	83,7 \pm 5,2
2	0,031	85,2 \pm 7,5
3	0,027	73,2 \pm 5,5
4	0,024	66,0 \pm 5,2
48	0,019	53,4 \pm 2,2

Příloha 8: Vliv teploty na stabilitu GLDH uchovávanou při 23 °C (n = 3)

Doba uchovávání [h]	$\Delta A/\Delta t$ [min]	Aktivita GLDH \pm SD [mU/ml]
0	0,031	86,3 \pm 4,7
1	0,027	75,0 \pm 7,0
2	0,024	67,3 \pm 9,6
3	0,021	56,9 \pm 5,2
4	0,020	56,3 \pm 5,3
48	0,014	37,2 \pm 2,2

Příloha 9: Vliv zamražení při -20 °C na stabilitu GLDH (n = 3)

Délka zamražení [den]	$\Delta A/\Delta t$ [min]	Aktivita GLDH \pm SD [mU/ml]
0	0,025	67,8 \pm 2,3
2	0,016	44,1 \pm 0,7
7	0,010	28,7 \pm 2,8
30	0,004	12,2 \pm 1,4

Příloha 10: Vliv zamražení při -80 °C na stabilitu GLDH (n = 3)

Délka zamražení [den]	$\Delta A/\Delta t$ [min]	Aktivita GLDH \pm SD [mU/ml]
0	0,025	67,8 \pm 2,3
2	0,021	59,1 \pm 2,5
7	0,013	34,5 \pm 3,2
30	0,014	37,6 \pm 1,9

Příloha 11: Aktivity enzymů v séru potkanů

skupina	potkan	ALT [mU/ml]	AST [mU/ml]	ALP [mU/ml]	GLDH [mU/ml]
1	1	75,6	181,8	111,6	3,9
	2	34,2	131,4	97,8	1,0
	3	57,6	154,2	150,6	0,0
	4	33,6	151,2	126,0	3,1
	5	40,2	161,4	132,6	2,3
	6	56,4	152,4	132,6	2,0
	průměr	49,6	155,4	125,2	2,0
	SD	16,5	16,3	18,4	1,4
2	7	exitus	exitus	exitus	exitus
	8	184,2	389,3	356,3	42,3
	9	191,4	489,5	234,6	24,7
	10	222,6	539,3	339,5	43,0
	11	114,6	314,9	268,7	19,7
	12	229,8	493,7	370,7	34,4
	průměr	188,5	445,4	314,0	32,8
	SD	45,7	91,2	59,2	10,4
3	13	43,2	104,4	126,6	0,0
	14	46,8	121,8	117,6	1,0
	15	37,2	97,8	94,8	0,7
	16	42,0	107,4	165,6	0,5
	17	38,4	107,4	85,2	0,0
	18	34,2	99,6	101,4	0,0
	průměr	40,3	106,4	115,2	0,4
	SD	4,6	8,5	28,9	0,4
4	19	124,8	274,1	271,1	40,2
	20	79,2	163,2	178,2	16,6
	21	69,0	189,0	255,5	21,4
	22	128,4	243,6	289,7	17,8
	23	88,2	199,2	278,9	9,3
	24	68,4	156,6	257,9	11,4
	průměr	93,0	204,3	255,2	19,5
	SD	27,0	46,2	39,9	11,1