

Enzymové a jiné markery využívané v diagnostice vybraných patologických stavů

Cíle a význam laboratorního vyšetření

- laboratorní vyšetření informují o probíhajících procesech v lidském organismu a jejich změnách
 - fyziologických i patologických
 - změny laboratorních hodnot mohou předcházet projevy nemoci
 - někt. změny se objevují v minutách od vzniku poškození
- 70 – 80 % lékařských rozhodnutí závisí na testech
 - nízké náklady (3 – 5 % celkových)
 - posledních 5 let nárůst
 - vyšetřování glukózy
 - molekulární biologie
- cíle
 - určení diagnózy
 - stanovení aktivity onemocnění a prognózy
 - monitorování odpovědi na léčbu
 - screening
 - výzkum nemoci

Rozdělení laboratorních vyšetření

- z hlediska dostupnosti
 - základní
 - rychle dostupná
 - speciální
 - vysoce specializovaná
 - centralizované provádění
- z hlediska požadavků na rychlost provedení
 - rutinní
 - statimová
 - do 60 minut od dodání vzorku
 - vitální indikace
 - do 30 minut od dodání vzorku
 - point-of-care testing
 - vyšetření na místě
 - ABR, kyslíkový metabolismus, diagnostické proužky – krev a moč

Obecné charakteristiky metody

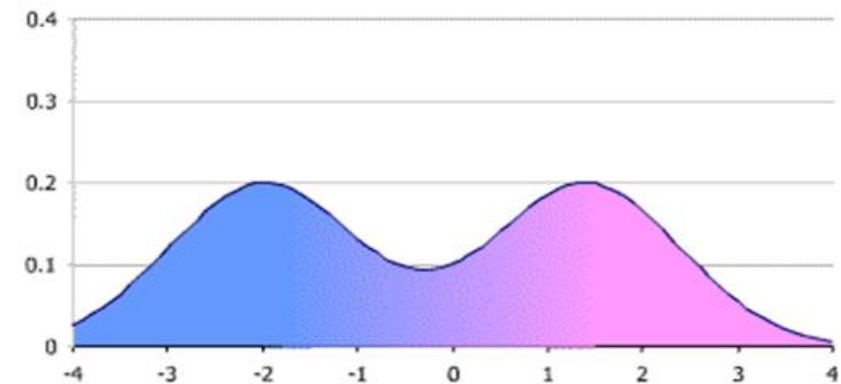
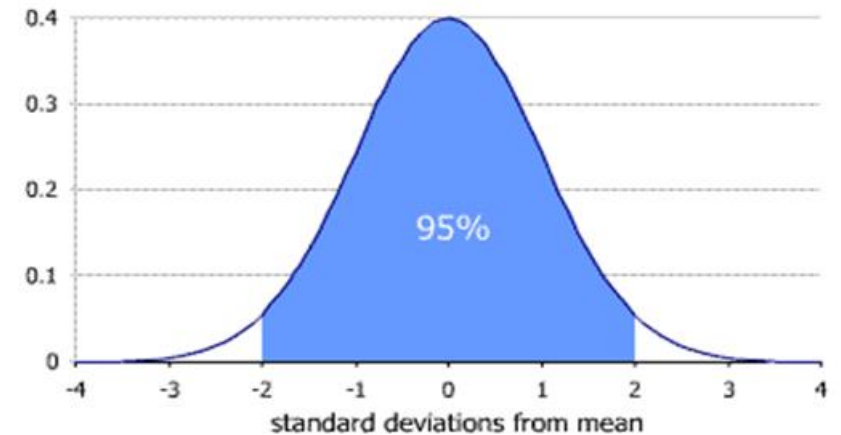
- stanovení požadovaného analytu může být prováděno řadou metod/postupů
 - různá výpovědní hodnota
- **spolehlivost metody**
 - dána přístroj. vybavením, kalibrací, správným uchováváním materiálu, kvalitou personálu
 - parametry
 - správnost = odchylka výsledku od skutečné hodnoty (náhodné a systematické vlivy)
 - přesnost
 - těsnost shody mezi vzájemně nezávislými výsledky analýzy
 - robustnost (=spolehlivost při běžném používání)
 - míra kapacity analytického postupu zůstat netečný vůči malým změnám parametrů metod
 - selektivita – schopnost rozlišovat mezi stanovovanou látkou a ostatními složkami
 - citlivost – nejmenší zjistitelný rozdíl

Validita testu

- předpokladem pro validitu testu je analytická spolehlivost
 - hranice, od které můžeme považovat změnu koncentrace analytu za pozitivní nález
 - u většiny analytů překryv mezi zdravými a nemocnými
 - skupina zdravých s pozitivním testem (falešně pozitivní)
 - skupina nemocných s pozitivním testem (správně pozitivní)
- parametry
 - **specificita** (Sp) – negativní test = negativní diagnóza
 - $Sp = \frac{\text{správně negativní}}{\text{správně negativní} + \text{falešně pozitivní}}$
 - ideálně 1, v praxi >0.95 velmi dobré, >0.7 ještě použitelné
 - vysoce spec. metody s nízkou falešnou poz. – konečná diagnóza u závažných chorob (falešná pozitivita = trauma)
 - **senzitivita** (Se) – pozitivní test = pozitivní diagnóza
 - $Se = \frac{\text{správně pozitivní}}{\text{správně pozitivní} + \text{falešně negativní}}$
 - vysoce senzitivní metody jsou dobré pro záchyt, ideálně u závažných léčitelných chorob, kde by neměl selhat screening
 - **efektivita** (Ef) = podíl správně určených ke všem vyšetřeným
 - $Ef = \frac{\text{správně pozitivní} + \text{správně negativní}}{\text{všichni}}$
 - zjednodušené vyjádření

Referenční interval

- raději než normální interval (co je normální?) se volí referenční interval hodnot u jasně definované referenční skupiny osob
 - co je referenční skupina?
 - zdraví, nebo spíše osoby bez takového zdrav. stavu, který přímo ovlivňuje / interferuje s měřenou veličinou
- stanovení
 - historicky: $x \pm 2 \text{ SD}$
 - tj. 95% normálně rozložených hodnot
- vlivy, které mohou ovlivňovat distribuci
 - věk, pohlaví, rasa, dieta, ...
- hodnoty mimo referenční interval
 - statistická/metodologická variabilita
 - biologická variabilita
 - 5% zdravé populace mimo



Průběh laboratorního vyšetření

- preanalytická část
 - mimo laboratoř (příprava vyšetřovaného, odběr, uchování a transport biologického materiálu) i v laboratoři
 - méně kontrolovatelná než analytická část
 - až 60% chyb
- analytická část
 - dodržování správné laboratorní praxe
 - interní a externí kontrola kvality – eliminace chyb
- postanalytická část
 - interpretace výsledků

Preanalytické vlivy na výsledek vyšetření

- osoba pacienta
 - faktory neovlivnitelné
 - pohlaví, rasa, věk, cyklické změny
 - gravidita, současně probíhající jiná nemoc
 - faktory ovlivnitelné
 - fyzická aktivita, stres, kouření
 - vliv alkoholu, potravy a tekutin
 - léky, operace
- odběr vzorku
- transport vzorku
- uchování vzorku
- prvotní zpracování a příprava vzorku k analýze
- hemolýza

Neovlivnitelné faktory

- pohlaví
 - hemoglobin, haptoglobin, železo
 - CK, GMT, AK, kyselina močová
- rasa
 - granulocyty
 - enzymy
 - genová frekvence
 - dědičné poruchy metabolismu
- věk
 - v dětství je referenční rozmezí častěji nižší
 - vyšší
 - ALP, fosfor
- sezonní vlivy
 - bilirubin, TAG, cholesterol
- cyklické změny
 - diurnální rytmus kortizolu
 - železo, močovina
- gravidita
 - bílkoviny i jiné látky produkované trofoblastem nebo orgány plodu
 - α -fetoprotein, placentární ALP
 - ALP, amyláza, kortizol, cholesterol
- současně probíhající jiná nemoc
- biol. poločas stanovované látky
 - falešně negativní výsledek při nevhodné volbě testu
 - infarkt myokardu

Ovlivnitelné faktory

- hmotnost
 - korelace cholesterolu, TAG, kortizolu, kys. močové s obezitou
- stravovací návyky
 - vysokoproteinová dieta
 - nárůst močoviny, cholesterolu, fosfátů
- kouření
 - zvyšuje cholesterol, TAG, kortizol, snižuje vitaminy B₁₂ a C
- alkohol
 - chronický abúzus
 - zvýšení ALT, AST, kortizolu
 - mírné dávky
 - přechodné zvýšení HDL
- styl života
- léky a drogy
 - vliv na biologické procesy (indukce enzymů, cytotoxicita), interference
- fyzická zátěž
 - závisí na délce a intenzitě
- zevní prostředí
 - nadmořská výška, teplota, cestování přes časová pásma
- mechanické vlivy
 - svalové trauma – zvýšení ALT, AST, CK, myoglobin

Faktory ovlivňující preanalytickou fázi

- odběr materiálu
 - označení vzorku, odběrový materiál, technika odběru
- transport materiálu
- skladování materiálu

Příklady zkreslených výsledků

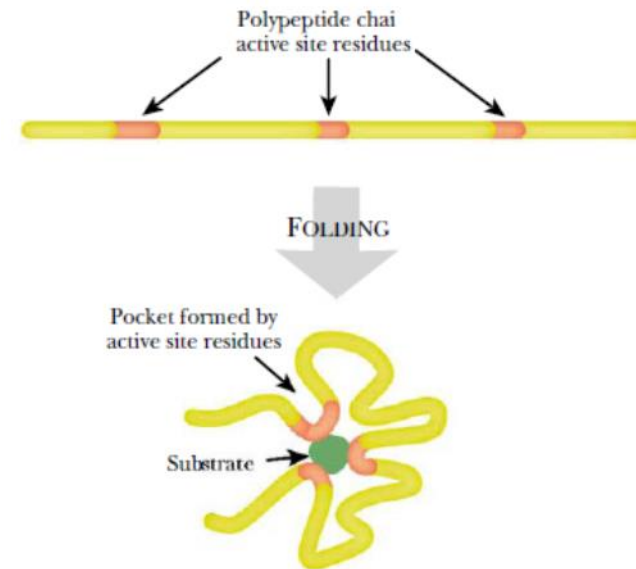
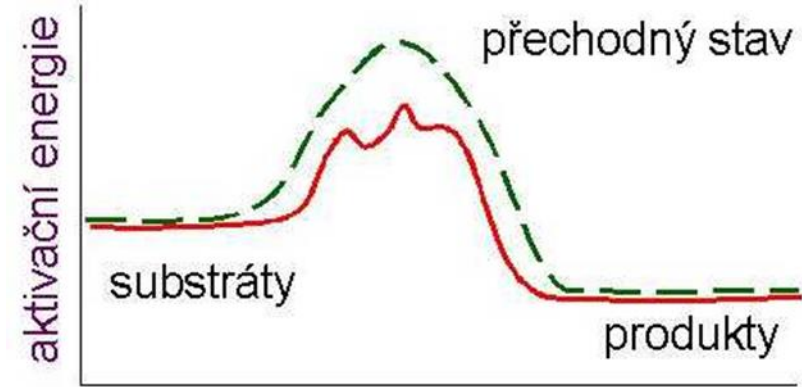
| analyt | výsledek | příčina |
|----------------|----------|--------------------------------|
| glukóza | ↑ | pacient není nalačno |
| TAG | ↑ | pacient není nalačno |
| kreatinin | ↑ | ↑ acetoacetát v plazmě |
| bilirubin | ↓ | dlouhotrvající expozice světlu |
| K ⁺ | ↑ | hemolýza |
| celkový vápník | ↓ | odebráno do EDTA |
| fosfát | ↑ | dlouhotrvající kontakt s Ery |
| kortizol | ↑ | stres |

Diagnostické markery

- cirkulující
 - ionty
 - Na, K, Cl, ...
 - metabolity
 - glukóza, cholesterol, TG, ...
 - odpadní produkty
 - urea, kreatinin, bilirubin, ...
 - nosiče či látky se specifickou funkcí (nejč. bílkoviny)
 - albumin, IgG, fibrinogen, další srážecí faktory, CRP, ...
 - enzymy
 - secernované
 - buněčné
 - markery abnormální proliferace a dediferenciace
 - mikrobiologické
- tkáňové/buněčné
 - molekulární
 - proteiny
 - kvantitativní změna exprese
 - RNA
 - kvantitativní změna transkripce (genové exprese)
 - DNA
 - kvalitativní průkaz poruchy - např. mutace/polymorfizmy
 - velké – cytogenetika
 - malé - PCR
 - kultivace buněk *in vitro*
 - mikrobiologické

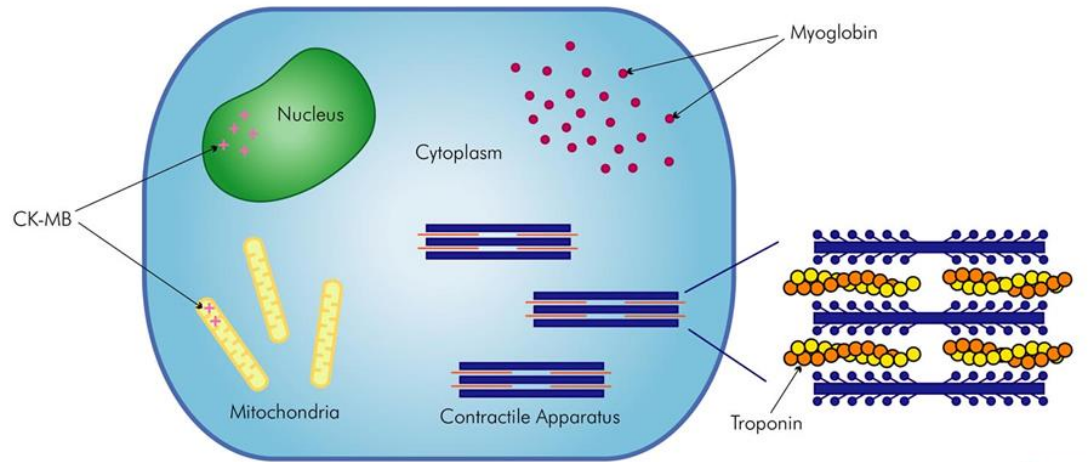
Enzymy

- biokatalyzátory
- snižují aktivační energii
- neovlivňují rovnovážný stav reakce
- bílkovina
- holoenzym = apoenzym + kofaktor
- kofaktor
 - prosthetická skupina
 - koenzym
- aktivní místo

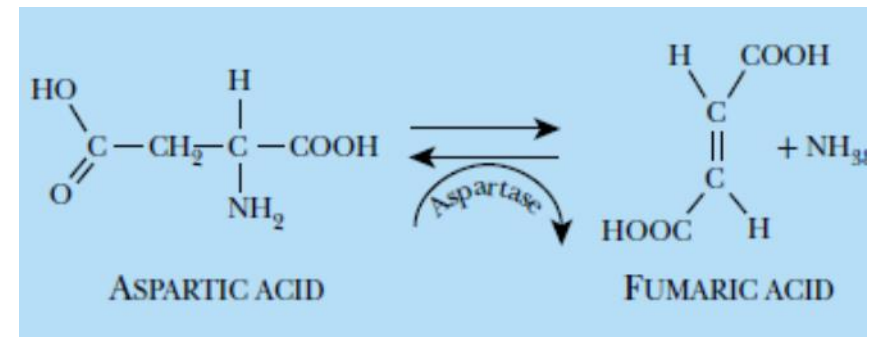


Lokalizace a vlastnosti enzymů

- extracelulární
- intracelulární
 - membránově vázané
 - cytosolické
 - organelové
- účinnost
- specifita – reakční a substrátová
- pracují za mírných podmínek
- snadno regulovatelné
- složitá struktura
- rychlé opotřebování



BECKMAN
CULTER



Plazmatické enzymy

- **specifické**

- enzymy srážení krve, ceruloplazmin, lipoproteinová lipáza

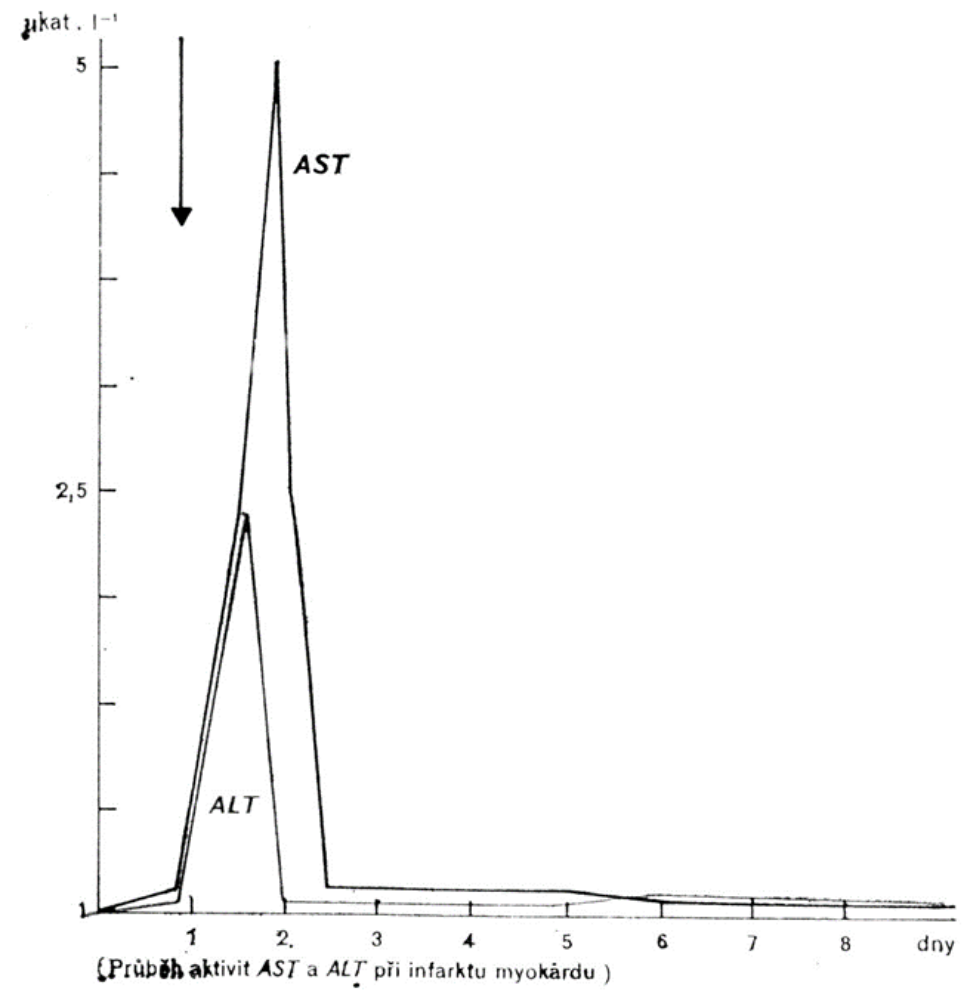
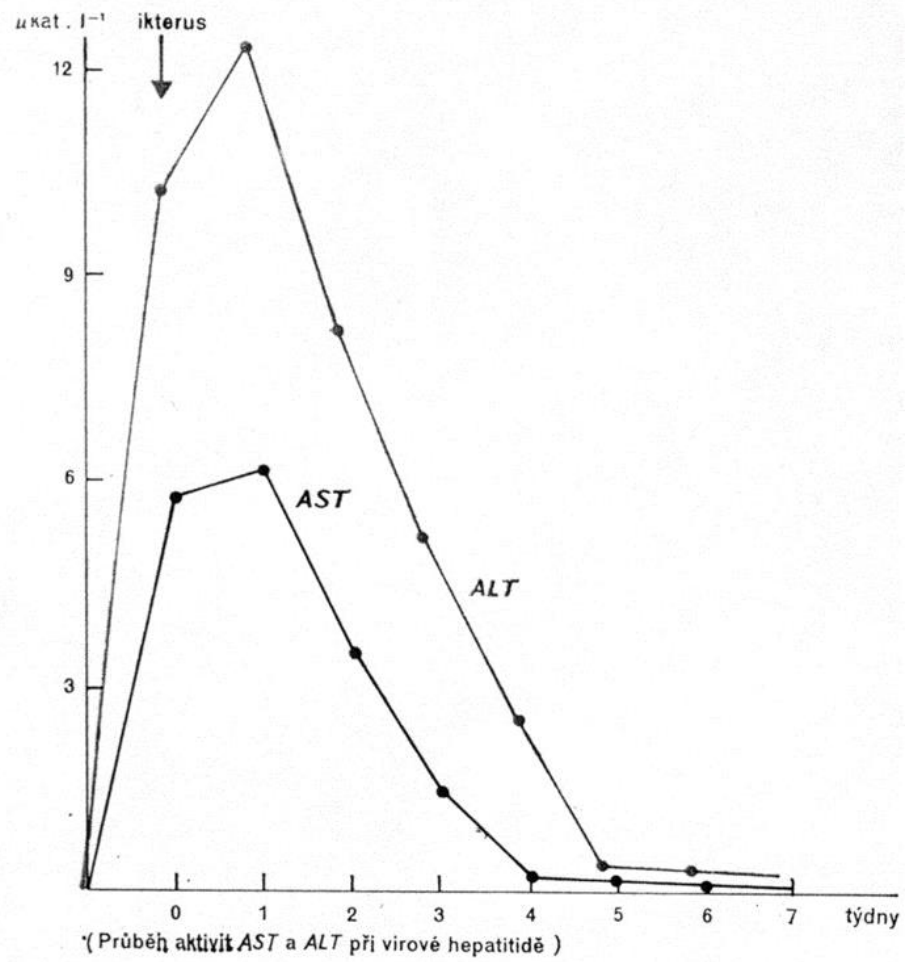
- **nespecifické**

- enzymy exokrinních žláz
 - amyláza, kyselá fosfatáza
- intracelulární enzymy
 - enzymy hlavních metabolických drah

Faktory ovlivňující koncentraci enzymů v plazmě

- aktivita enzymu v buňce
- lokalizace enzymu v buňce
- propustnost cytoplazmatické membrány
- míra poškození buněk
- celková masa postižených buněk
- rychlost eliminace enzymu
- enzymový „vzorec“ orgánu
- závisí na
 - specifické aktivitě enzymu
 - zastoupení izoenzymů
- změna v průběhu ontogeneze
- uvolnění enzymů – indikátor poškození

Příklad

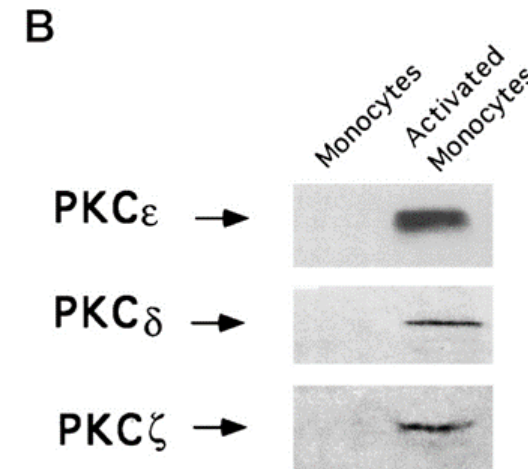
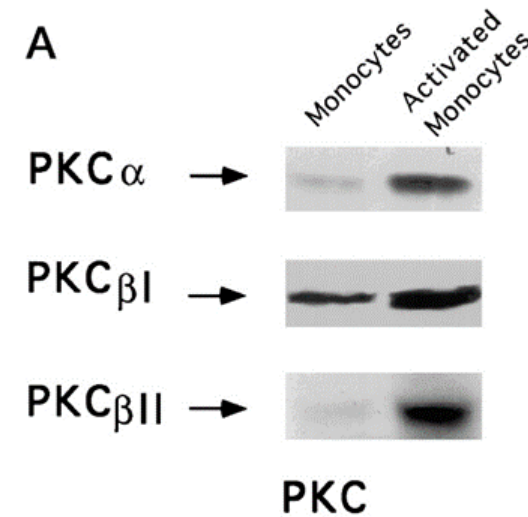


Formy výskytu enzymů

- **proenzymy** (zymogeny)
- **izoenzymy**
 - primární
 - sekundární
- příklady
 - laktátdehydrogenáza, kreatinkináza, PKC

Detekce izoenzymů

- fyzikálně-chemicky
 - elektroforéza
 - chromatografie
- imunochemicky
- chemicky
 - stanovení reakční rychlosti za různých podmínek – pH, t, c substrátu



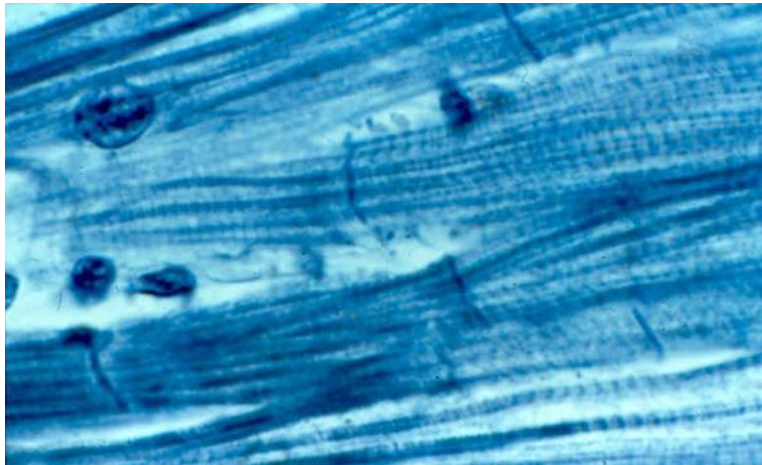
Li Q et al. *J. Biol. Chem.* 1999;274:3764-3771

SRDEČNÍ MARKERY



Laboratorní diagnostika nekrózy myokardu

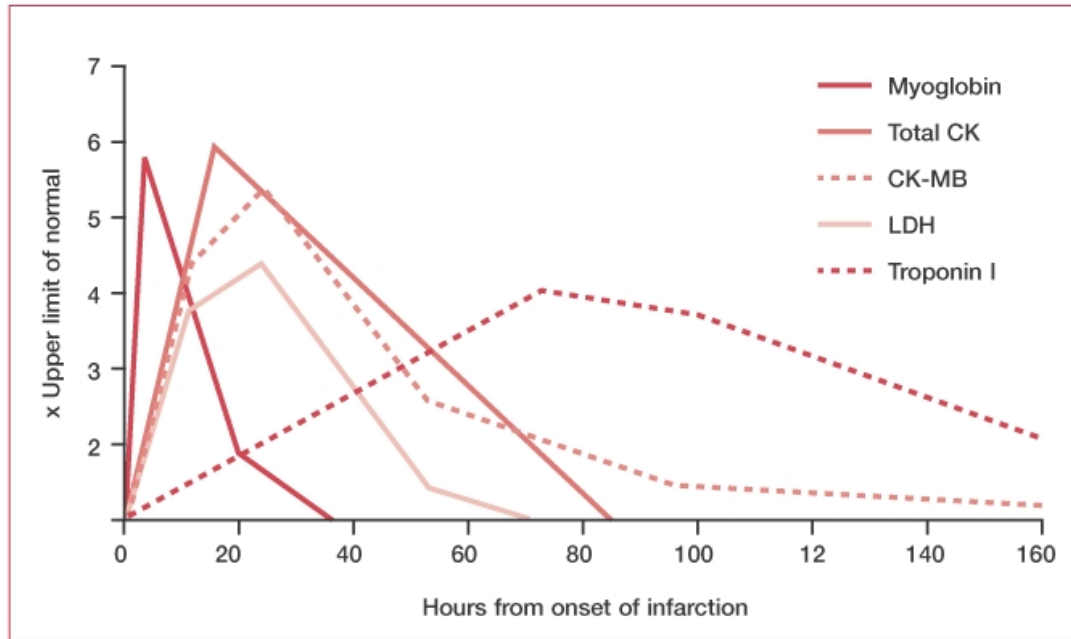
- čím je molekula menší, tím rychleji uvolňována (clearance)
- proteiny vázané na membránu jsou uvolňovány > než cytosolické > vázané na kontraktilní aparát
- specificita pro myokard = troponiny 100%



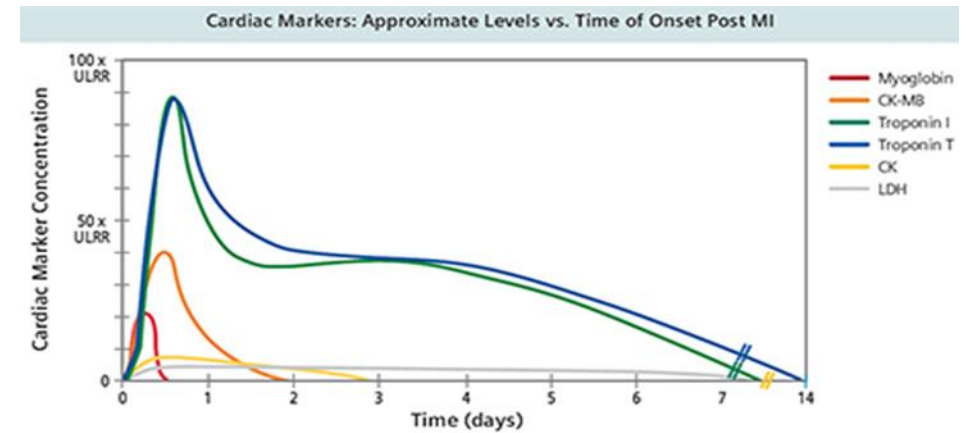
- klasicky
 - myoglobin
 - kreatinkináza (CK)
 - isoenzym CK-MB
 - troponiny I a T (TnI a TnT)
 - aspartátaminotransferáza (AST)
 - laktátdehydrogenáza (LDH)
- nověji
 - heart fatty acid binding protein (HFABP)
 - natriuretický peptid B (BNP)
 - ischemií modifikovaný albumin (IMA)
- ve zkoušení
 - karboanhydráza III
 - lehké řetězce myosinu (MLC)

Dynamika srdečních markerů

V prvních hodinách



V horizontu dní



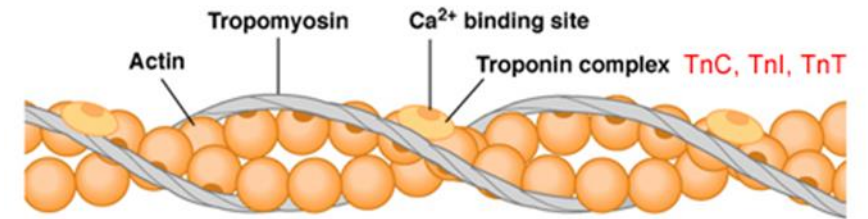
Srdeční strukturální a funkční proteiny – časná diagnostika IM

- **myoglobin**

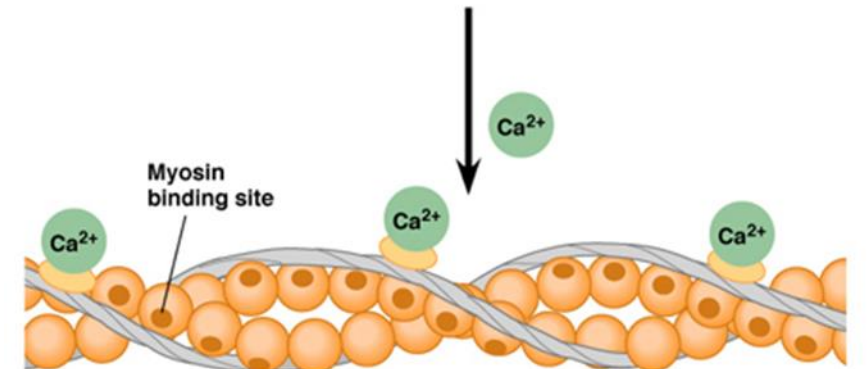
- intracelulární protein srdečních i kosterních svalových buněk účastní se aerobního metabolismu
- při poškození buněk se vyplavuje velmi rychle do krevního oběhu (za 0.5 až 2 h)
- nejmenší ze srdečních markerů (~18kDa) - rychle se zvyšuje a velmi rychle se odbourává (normalizace do 24 hod.)
- vzhledem k výskytu myoglobinu i v buňkách kosterních svalů je markerem nespecifickým
 - myopatie, úrazy, renální selhání

- **troponiny**

- troponinový komplex – součást strukturálních proteinů, které se podílí na kontrakci příčně pruhovaných svalů
 - heterotrimer složený z troponinů I, T a C
- těsně spojen s kontraktilním aparátem – nízké koncentrace srdečních troponinů v oběhu
 - není-li srdeční sval poškozen, koncentrace TnI je prakticky nulová a to i při poškození kosterního svalstva = vysoká senzitivita
- srdeční izoforma troponinu I (TnI) se strukturně liší od analogické izoformy v kosterním svalu – absolutní kardiospecificita



(a) Myosin binding sites blocked; muscle cannot contract



(b) Myosin binding sites exposed; muscle can contract

Troponiny

- **výhody** stanovení TnI
 - absolutní kardiospecifita
 - dlouhá doba vylučování – sledování průběhu
 - citlivost – detekce menších poškození
 - není ovlivněn chronickou renální insuficiencí
- **nevýhody** stanovení TnI
 - pomalejší nástup než myoglobin (nespecifický)

| | Myoglobin | TnI | CK-MB |
|-------------------|-----------|-----------|---------|
| je zvýšená po | 0,5 - 2 h | 3 - 6 h | 3 – 8h |
| vrcholí mezi | 5 - 12 h | 14 - 20 h | 9-30 h |
| přetrvává zvýšená | 18 – 30 h | 5 - 7 dnů | 48-72 h |

Srdeční enzymy

- **kreatinkináza (CK)**
 - cytoplazma a mitochondrie
 - katalyzuje reverzibilní přenos fosfátu z ATP na kreatin
 - $\text{ATP} + \text{kreatin} \rightarrow \text{ADP} + \text{kreatinfosfát}$
 - dimer – M (muscle) a B (brain)
 - 3 izoformy
 - **CK-BB – hladký sval, mozek, prostata**
 - **CK-MB – myokard (kosterní sval)**
 - 40% CK v myokardu
 - **CK-MM – kosterní sval, myokard**
 - CK-MB – diagnóza akutního infarktu myokardu a monitorování reperfuze v průběhu trombolytické léčby AMI
- AST
 - aktivita i koncentrace
- LDH

Dynamika kardiomarkerů

| enzym | počátek vzestupu | maximum | normalizace | násobek v maximu |
|------------|------------------|---------|-------------|------------------|
| AST | 4-8 hod | 16-48 | 3-6 d | do 25 |
| CK | 3-6 hod | 16-36 | 3-5 d | do 25 |
| LD | 6-12 hod | 24-60 | 7-15 d | do 8 |
| myoglobin | 0,5-2 hod | 6-12 | 0,5-1 d | do 20 |
| troponin I | 3,5-10 hod | 12-18 | 7-20 d | do 300 |

JATERNÍ MARKERY



Laboratorní diagnostika v hepatologii

- jaterní poškození je v praxi časté
- významný vývoj v posledních letech
 - pokles akutních poškození (HAV, HBV)
 - nárůst chronických (HCV)
 - 170 mil. osob (3% světové populace)
 - cirhóza – vzestup mortality
 - nárůst HCC (5. nejčastější malignita celosvětově)
- hepatologie
 - velký význam laboratorních vyšetření (především biochemické a sérologické)

Biochemická vyšetření jater

- rozdělení testů
 - statické – hodnocení okamžité metabolické situace
 - ALT, AST, GMT, ALP, proteiny, lipidy, bilirubin, žlučové kyseliny
 - dynamické – určení funkční jaterní rezervy
 - bromsulfoftalein, galaktóza, lidokain, antipyrin
- jaterní vyšetření obecně
 - často nespecifické
 - není žádný jednoduchý test, vždy kombinace několika
 - v počáteční fázi onemocnění – dlouhodobě falešně negativní výsledky
 - racionální postup a volba vyšetření
 - standardizace metod v laboratořích není optimální, postupy se liší i mění
 - opakované vyšetření v časovém horizontu je přínosnější než jednorázové (prognóza)

Dělení biochemických vyšetření jater

- ukazatelé poškození hepatocytů
 - ALT, AST, LDH
- ukazatelé obstrukce žlučových cest
 - ALP, GMT
- ukazatelé syntetické funkce jater
 - albumin, CHE, LCAT, PT
- testy konjugace a jaterního transportu organických aniontů
 - bilirubin, urobilinogen

Markery poškození hepatocytů

- **Alaninaminotransferáza (ALT)**

- L-alanin+2-oxoglutarát → pyruvát+L-glutamát
- reverzibilní reakce
 - syntéza, odbourávání i přeměna aminokyselin
- cytoplazmatický enzym
- nejvíce je obsažen v hepatocytech, hladina zvýšena již při poruše membránové permeability

- **Aspartátaminotransferáza (AST)**

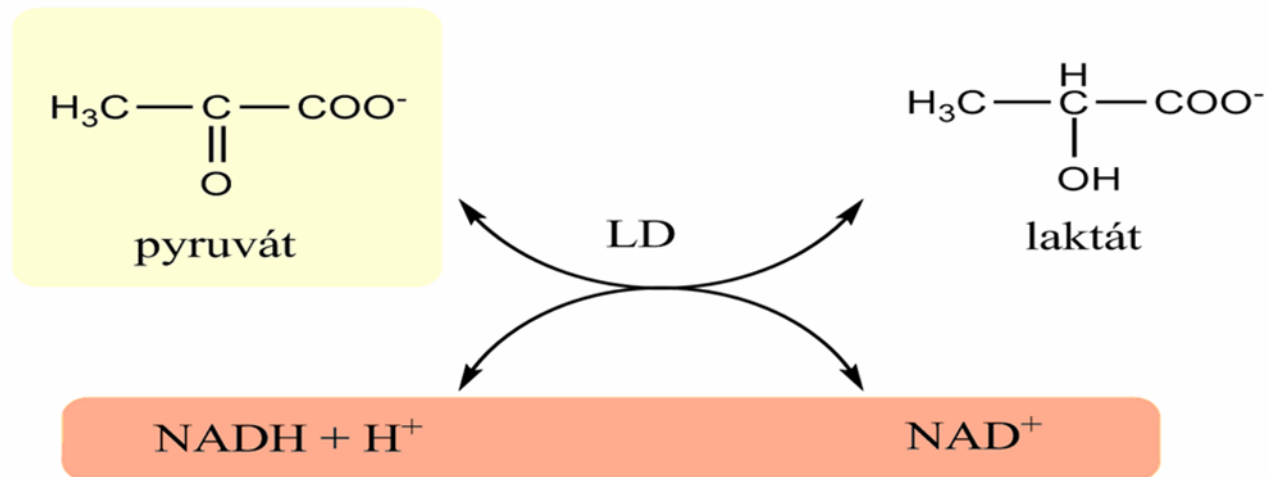
- L-aspartát+2-oxoglutarát → oxalacetát+L-glutamát
- reverzibilní reakce
 - syntéza, odbourávání i přeměna aminokyselin
- cytoplazmatický a mitochondriální izoenzym
- játra, myokard, kosterní sval, ledviny a pankreas
- Uvolnění cytoplazmatického izoenzymu při narušení permeability membrány, uvolnění mitochondriálního izoenzymu při nekrózu

Interpretace ALT/AST

- zvýšení aktivity ALT i AST u mnoha jaterních chorob
 - extrémně vysoké hodnoty (10-100x) u toxických a akutních virových hepatitid a šokových stavů
- aktivita aminotransferáz v plazmě neříká nic o exkretorické či metabolické funkci hepatocytů
- není vždy korelace mezi hladinou aminotransferáz a závažností jaterní léze
- De Ritisův index = AST/ALT
 - méně než 0,7...dobrá prognóza
 - 1 a více...špatná prognóza (nekróza)
- za normálního stavu i u většiny jaterních chorob $ALT > AST$
- výjimky - $AST/ALT > 2$
 - alkoholické poškození
 - postnekrotické cirhózy
- glutathion-S-transferáza
 - indikátor hepatocelulárního poškození
 - vysoká cena a horší dostupnost

Laktátdehydrogenáza

- LDH 1 a LDH 2 – přeměna laktátu na pyruvát ve tkáních s aer. metabolismem
- LDH 4 a LDH 5 – pyruvát na laktát ve tkáních s anaer. glykolýzou



Markery obstrukce žlučových cest

- **alkalická fosfatáza (ALP)**
 - membránový enzym
 - hydrolýzu fosfátových esterů při alkalickém pH
 - tetramer, do cirkulace je z membrán uvolňovaný jako dimer
 - široce rozšířená
 - játra, střevo a kost (různé izoenzymy)
 - posouzení kostních a hepatobiliárních onemocnění
 - značná část jaterní ALP v membránách buněk výstelky žlučových cest – při cholestáze narušení membrán mechanicky a účinkem žlučových kyselin
 - kromě cholestázy zvýšená i u dalších stavů (tumory jater, cirhóza)
- **γ -glutamyltransferáza (GMT)**
 - membránový enzym
 - játra, ledvina, pankreas, střevo a prostata
 - katalyzuje přenos γ -glutamylu z glutathionu na aminokyselinu a umožňuje tak transport aminokyseliny přes buněčnou membránu.
 - vyskytuje se hlavně v játrech, ledvinách, tenkém střevě a v prostatě
 - posouzení hepatobiliárních onemocnění

Markery syntetické funkce jater

- **albumin**

- tvořen v játrech, určení hladiny v séru
- dlouhý poločas – neklesá u akutních poruch
- vyloučení jiné příčiny poklesu (malabsorpce, snížený přívod bílkovin, onemocnění ledvin) – jde o jaterní poškození
- výrazné snížení u alkoholických cirhóz

- **cholinesteráza**

- sekreční enzym produkováný jaterními buňkami do krve
- v plazmě katalyzuje hydrolytické štěpení esterů cholinu a některých dalších substrátů
- syntéza cholinesterázy a s tím i její aktivita v plazmě klesá v případě poškození jaterního parenchymu nebo při nedostatku proteinů v dietě
- nevratně je enzym inhibován organofosfáty

Markery syntetické funkce jater

- **hemokoagulační faktory**

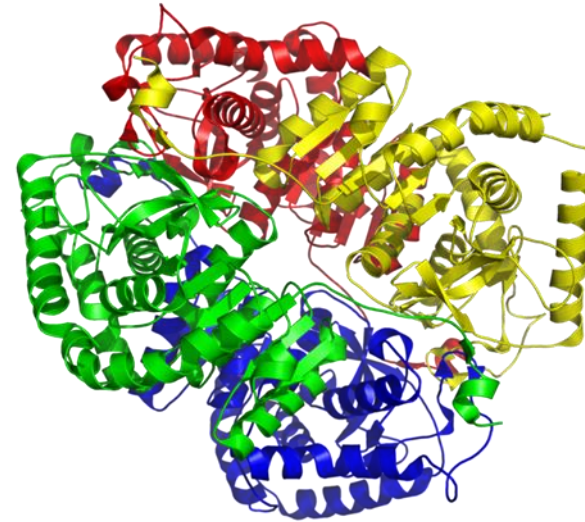
- tvořeny v játrech, krátký poločas – jejich změny jsou rychlé
- Quickův test – vnější cesta aktivace koagulačního systému
 - hodnoty se mění u onemocnění jaterního parenchymu provázených poruchou proteosyntézy
 - nebo u obstrukčního ikteru s poruchou vstřebávání tuků a v nich rozpustných vitaminů

Praktické cvičení

Stanovení izoenzymů LDH ve vzorku séra

Laktátdehydrogenáza (LDH)

- tetramer
 - M (gen LDHA, ch.11)
 - H (gen LDHB, ch.12)
- LDH₁ (HHHH) **31-49%**
 - srdce, erytrocyty
- LDH₂ (HHHM) **38-58%**
 - retikuloendoteliální systém
- LDH₃ (HHMM) **5.5-16.5%**
 - plíce
- LDH₄ (HMMM) **0-0.7%**
 - ledviny
- LDH₅ (MMMM) **0-1.5%**
 - kosterní sval, játra



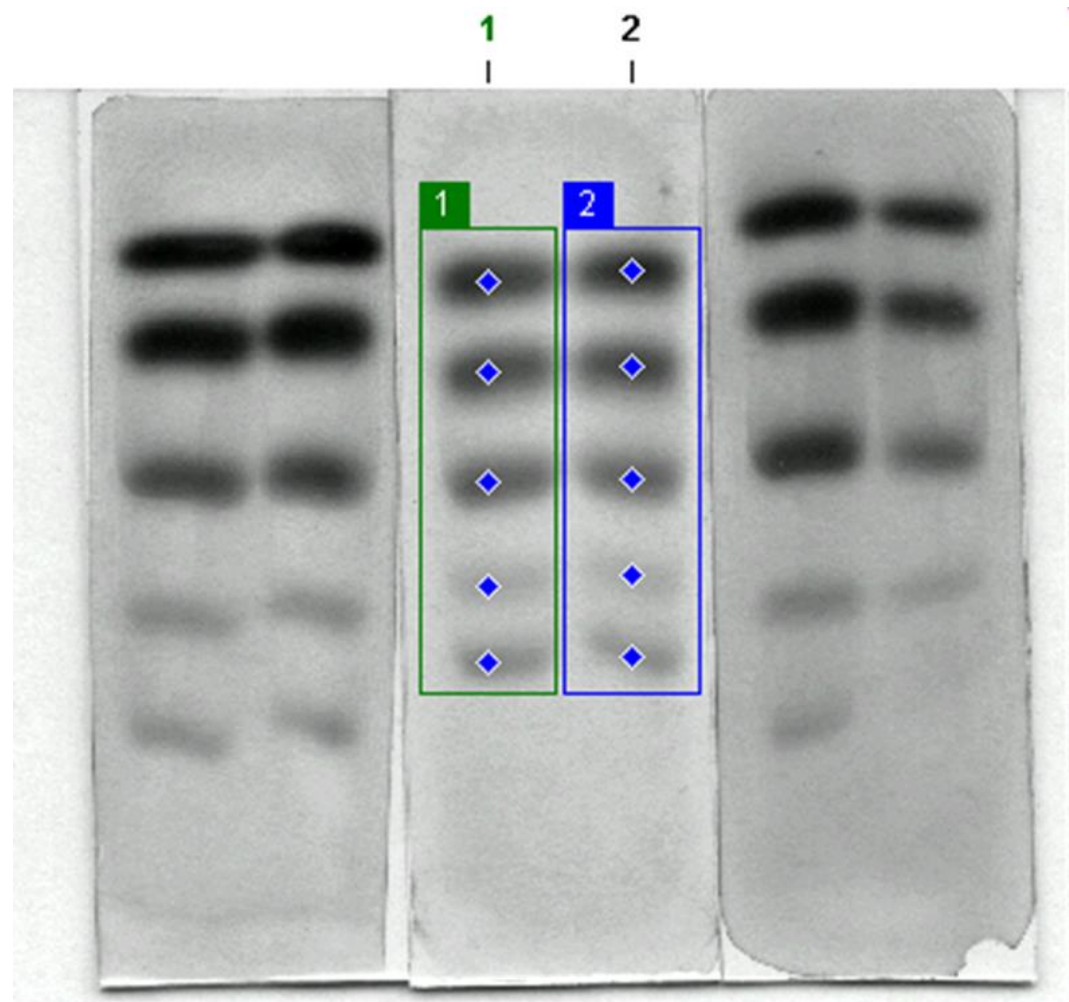
Elektroforetické dělení LDH

- izoenzymy se liší nábojem → elfo
- agaróza s barbitalovým pufrem
- barvicí roztok
 - lithium laktát
 - NAD⁺
 - barvivo (NBT)
 - fenazinmethosulfát – přenašeč elektronů mezi NADH a barvivem
- 5 % kyselina octová

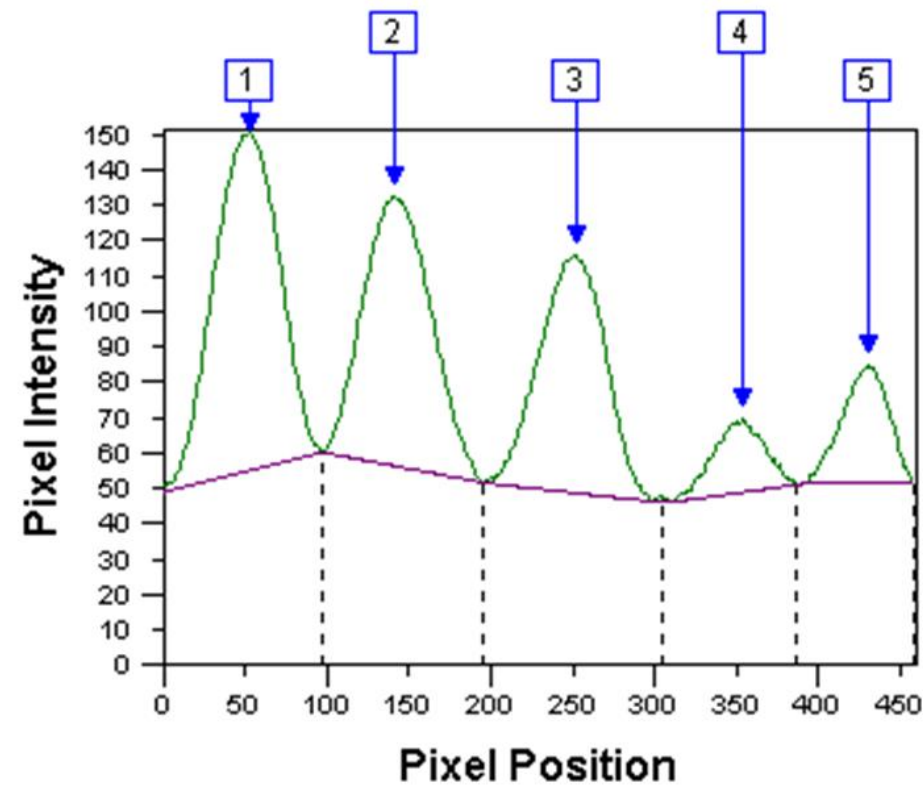
Detekce LDH



Detekce elektroforetických drah



Denzitometrické rozdělení



Kvantitativní stanovení katalytické aktivity

- absorpční spektrofotometrie
 - diag. souprava LDH IFCC ROCHE
- rychlost vzniku NADH je přímo úměrná katalytické aktivitě LDH, měří se nárůst absorbance při 340 nm
- preanalytická fáze
 - žádné nadstandardní požadavky
 - standardní odběr krve, stanovení v séru nebo plazmě (heparin)
- použití
 - onemocnění kosterních svalů, hemolytických anemií, non-hodgkinských lymfomů a dalších hematologických chorob, u testikulárních germinálních tumorů

Interpretace výsledků

- příčiny zvýšení aktivity v séru
 - hemolýza (i arteficiální)
 - stoupá izoenzym H4
 - infarkt myokardu
 - stoupá izoenzym H4
 - onemocnění jaterního parenchymu
 - stoupá izoenzym M4
 - onemocnění svalů
 - zvýšení není tak výrazně
 - další choroby
 - perniciózní anémie, tumory, leukémie, embolizace do plicnice