

MUNI  
MED

# Enzymové a jiné markery využívané v diagnostice vybraných patologických stavů

Ústav patologické fyziologie LF  
MU

# 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

Tabulka 1  
Před- a pooperační hodnoty nádorových markerů u karcinomu kolorekta, prsu a ovarií

Kolorektální karcinom				
	Marker	Průměr + SD	Medián	Min.-Max.
Předoperační hodnoty	CEA (ng/ml)	21.01 + 33.04	3.4	0.5-142.7
	CA 19-9 (U/ml)	87.18 + 51.28	16.5	2.9-655.0
	CA 72-4 (U/ml)	5.91 + 7.44	2.1	1.3-25.6
Pooperační hodnoty	CEA (ng/ml)	9.19 + 33.03	1.7	0.5-110.0
	CA 19-9 (U/ml)	27.78 + 45.84	12.9	2.9-240.0
	CA 72-4 (U/ml)	3.51 + 6.41	1.6	1.1-25.6
Karcinom prsu				
	Marker	Průměr + SD	Medián	Min.-Max.
Předoperační hodnoty	CEA (ng/ml)	21.67 + 29.75	2.7	0.5-500.0
	CA 15-3	44.68 + 134.64	35.1	7.5-1701.0
	TPA (U/l)	126.57 + 297.13	56.0	10.0-2173.0
Pooperační hodnoty	CEA (ng/ml)	4.30 + 7.00	1.3	0.1-132.0
	CA 15-3 (U/ml)	25.88 + 41.30	18.0	6.0-706.8
	TPA (U/l)	65.72 + 83.70	44.0	10.0-612.0
Ovariální karcinom	CA 125 (U/ml)	432.09 + 611.31	165.6	7.1-3455.0
	CA 19-9 (U/ml)	78.38 + 168.77	12.5	0-843.3
	CA 72-4 (U/ml)	21.67 + 29.75	7.1	2.0-105.9
Pooperační hodnoty	CA 125 (U/ml)	159.07 + 790.37	35.2	7.0-2729.5
	CA 19-9 (U/ml)	21.67 + 29.75	8.4	7.4-240.0
	CA 72-4 (U/ml)	10.57 + 29.64	3.0	1.0-87.0

- 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



- Iontogram séra – Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, fosfáty
- Iontogram moči – Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, fosfáty
- Ukazatele acidobazické rovnováhy a laktát
- **Astrup** – pH, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, BE
- Vyšetření moči – urea, kreatinin v séru a v moči, clearance kreatininu, bilance dusíku, kyselina močová
- Vyšetření jater – bilirubin, amoniak, ALT, AST, GGT, ALP, LD, amylasa, lipáza
- Vyšetření metabolismu – glukóza, cholesterol, triacylglyceroly
- Vyšetření nutriční – albumin, prealbumin, transferin
- Kardiomarkery – CK, CK-MB, CK-MB mass, myoglobin, troponin T nebo I
- Markery zánětu – CRP, prokalcitonin

# 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 zjištěitelný 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
  - **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
  - **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)
  - **efektivita** (Ef) = podíl správně určených ke všem vyšetřeným
    - $Ef = \frac{\text{správně pozitivní} + \text{správně negativní}}{\text{všichni}}$
    - zjednodušené vyjádření

### Příklad:

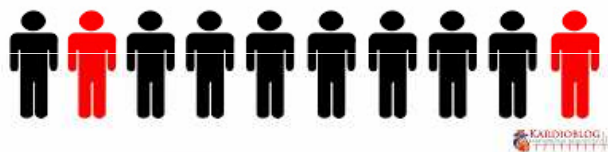
Máme skupinu 10 mužů, z nichž je 8 zdravých a 2 mají nádor prostaty. U všech jsou změřeny hladiny PSA a na základě testů je posláno 6 zdravých mužů domů (SN), 2 zdraví muži (2FP) a 2 muži s nádorem (SP) na biopsii.

Specificita testu:  $\frac{6SN}{6SN+2FP} = 75\%$  specificita

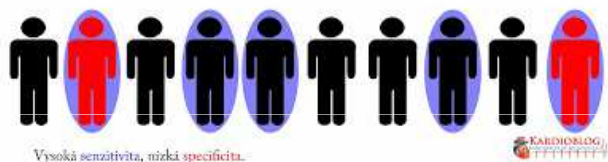
Senzitivita testu:  $\frac{2SP}{2SP+0FN} = 100\%$  senzitivita

Výsledek je že díky PSA stanovení jsme zachytili všechny pacienty s nádorem prostaty (100% senzitivita), ale bohužel jsme poslali zbytečně dva zdravé muže na biopsii (75% specificita).

- **Senzitivita** se zajímá pouze o nemocné pacienty. Dejme tomu, že test má 100% **senzitivitu** (což se nikdy ve skutečnosti nestane). Máme 10 pacientů, které pomocí testu vyšetříme. Nemoc mají doopravdy jen 2 z nich.



- Pokud má test 100% **senzitivitu**, znamená to že odhalí všechny (2) nemocné. K tomu ale „omylem“ přibere i několik zdravých lidí.

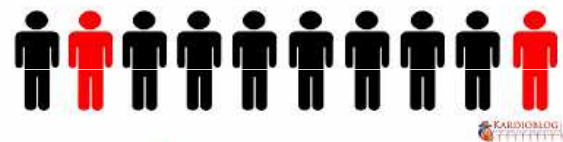


Vysoká senzitivita, nízká specifita.

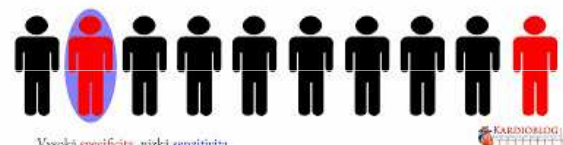
- Ti lidé, kteří mají test **negativní**, mají jistotu, že jsou zdraví.

Testy s vysokou **senzitivitou** se hodí u screeningových vyšetření, kdy kupříkladu vyšetříte celé město na fenylketonurii a získáte 40 lidí, kteří mají test pozitivní. Díky 100% senzitivě máte jistotu, že jste objevili všechny nemocné s fenylketonurií v celém městě. Nyní na oněch 40 „pozitivních“ lidí můžete nasadit testy, které jsou specifické. Proč? Protože (příklad) 37 z nich může být ve skutečnosti zdravých!

- Specifita se naopak zajímá o pacienty, kteří vyšetřovanou nemocí netrpí. Dejme tomu, že test má tentokrát 100% **specifitu**. Máme 10 pacientů, které pomocí testu vyšetříme, z nichž nemoc mají doopravdy jen 2 z nich.



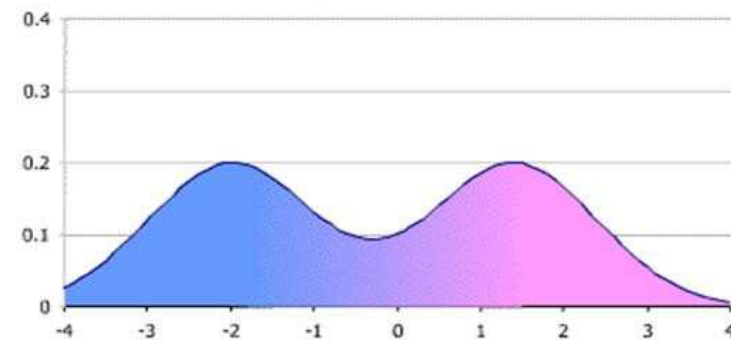
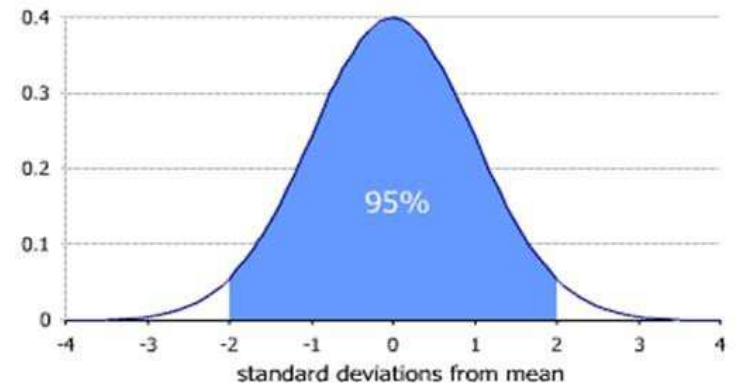
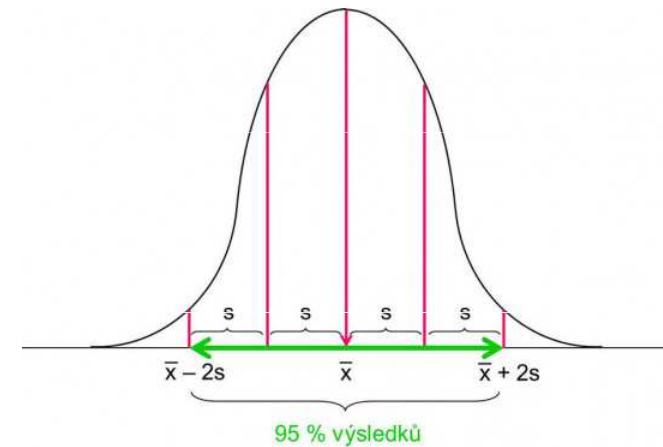
- Pokud má test 100% **specifitu**, znamená to test nebude pozitivní ani u jednoho z 8 zdravých lidí. Všichni zdraví budou mít test negativní. Problém je, že negativní test budou mít i někteří nemocní lidé a to my nechceme. Zde je **senzitivita** 50%.



Vysoká specifita, nízká senzitivita.

# Referenční interval

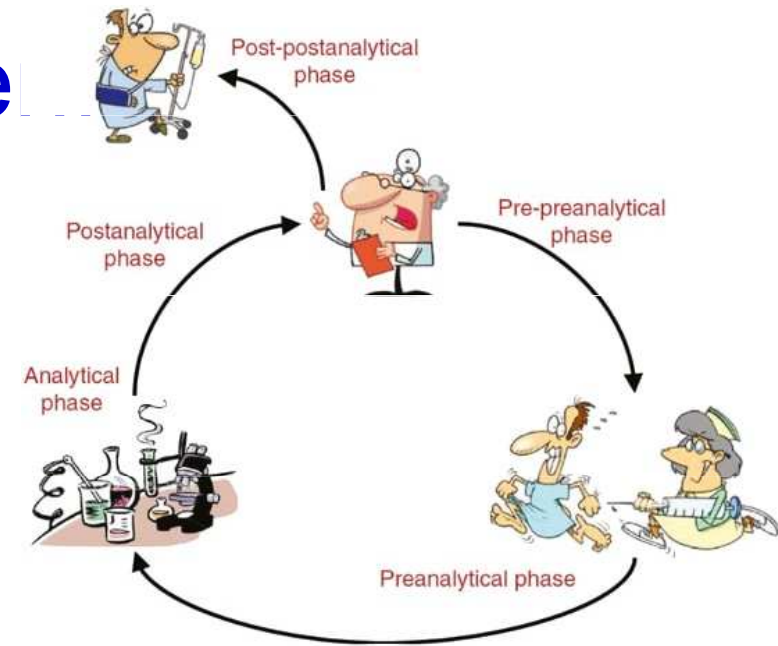
- raději než normální interval (co je normální?) se volí referenční interval hodnot u jasně definované referenční skupiny osob
  - co je referenční skupina?
    - zdraví, nebo spíše osoby bez takového zdrav. stavu, který přímo ovlivňuje / interferuje s měřenou veličinou
- stanovení
  - historicky:  $x \pm 2 SD$ 
    - 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



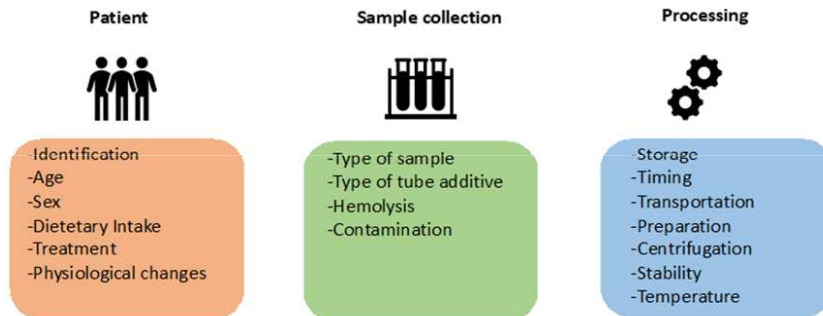
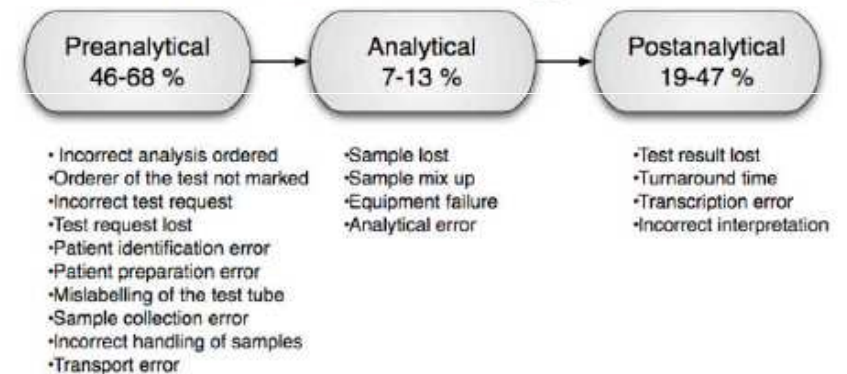


# Průběh laboratorního vyšetře

- 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



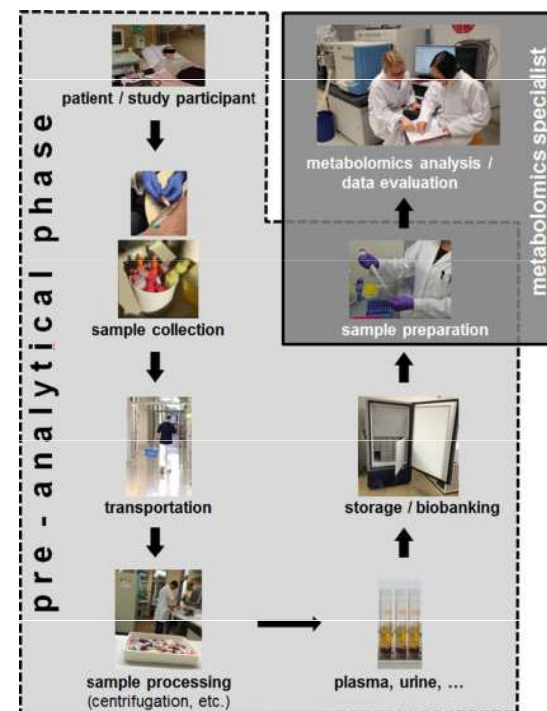
Errors within the total testing process





# 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



# Neovlivitelné faktory

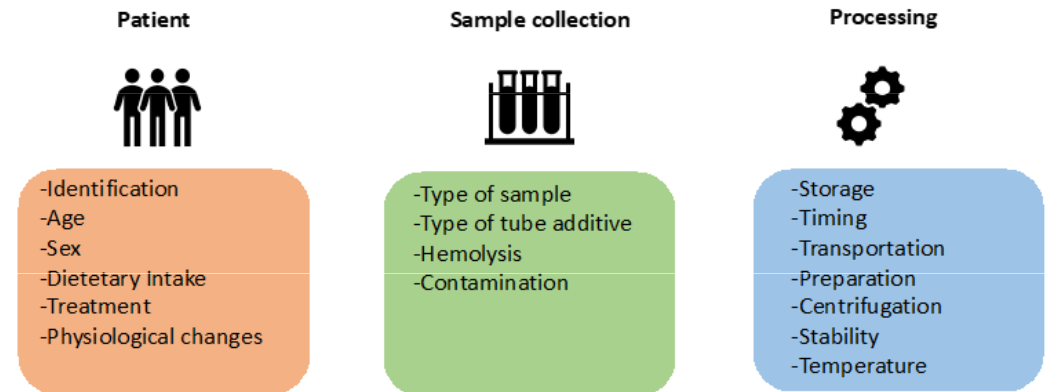
- pohlaví
  - hemoglobin, haptoglobin, železo
  - CK, GMT, AK, kyselina močová
- rasa
  - granulocyty
  - enzymy
  - genová frekvence
    - dědičné poruchy metabolismu
- věk
  - v dětství je referenční rozmezí častěji nižší
  - vyšší v dětství
    - ALP, fosfor, lymfocyty
- sezonní vlivy
  - bilirubin, TAG, cholesterol
- cyklické změny
  - diurnální rytmus kortizolu
  - železo, močovina
- gravidita
  - bílkoviny i jiné látky produkované trofoblastem nebo orgány plodu
    - $\alpha$ -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, kys.močové, cholesterolu, fosfátů, kreatinu
- **kouření**
  - zvyšuje cholesterol, TAG, kortizol, snižuje vitaminy B<sub>12</sub> 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 (CK, myoglobin)
- **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



(accounting for 48%-62% of total errors in laboratory medicine)

## PRE-PRE-ANALYTICAL ERRORS

- Inappropriate test request
- Order entry mistakes
- Patient/sample misidentification
- Sample collection (hemolysis, clotting, insufficient volume, etc)
- Sample collection from infusion route
- Inappropriate container
- Sample handling, storage and transportation problems

## PRE-ANALYTICAL ERRORS

- Labeling (secondary specimens) errors
- Sorting and routing errors
- Pour-off errors
- Specimen-processing errors (centrifugation, decapping, aliquoting, etc.)

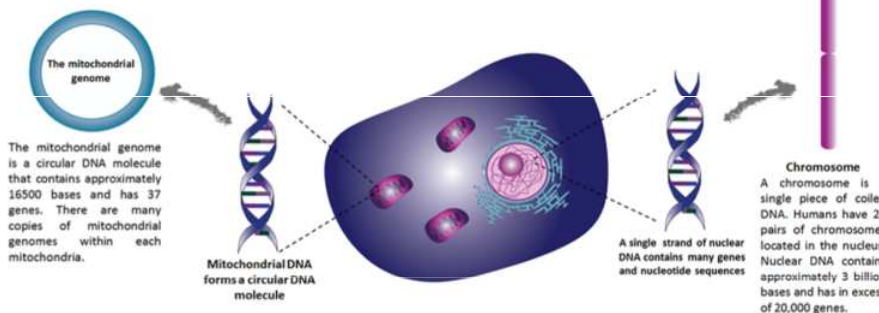
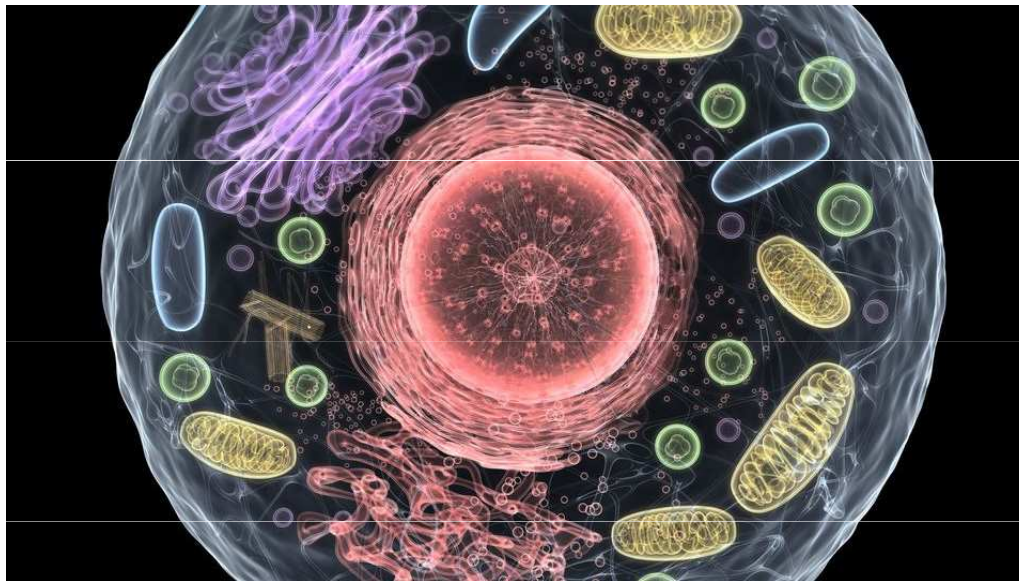
# Příklady zkreslených výsledků

analyt	výsledek	příčina
glukóza	↑	pacient není nalačno
TAG	↑	pacient není nalačno
kreatinin	↑	↑ acetoacetát v plazmě
bilirubin	↓	dlouhotrvající expozice světlu
K <sup>+</sup>	↑	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

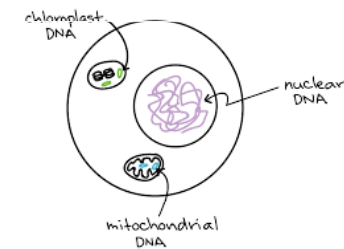
# Nukleové kyseliny



Hostitelské NK/Infekční částice

## INTRACELULÁRNÍ

- DNA - jádro, mitochondrie, „exclusome“
- RNA- mRNA a ncRNA (miRNA, siRNA)

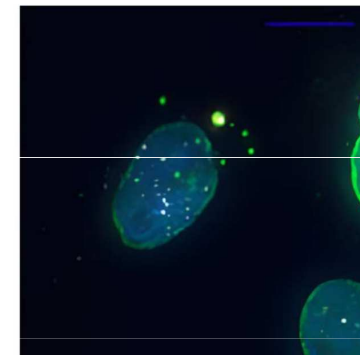


OCTOBER 2, 2023

Editors' notes

**Cell biologists identify new organelle present in mammalian cells made of rings of DNA**

by Peter Rieggl, ETH Zurich

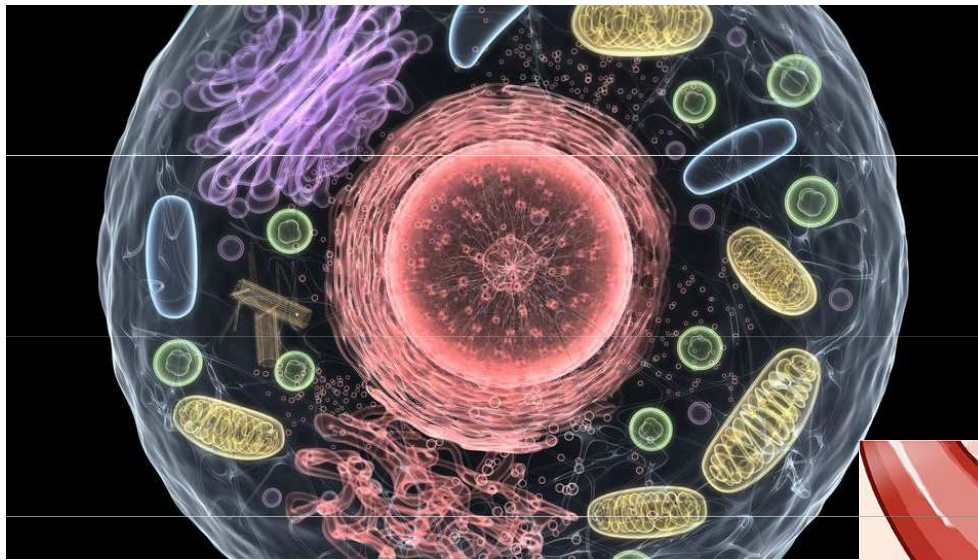


Almost like a moon in a planet, the exclusome (yellow-green dot) lies in the cytoplasm near the nucleus (blu...

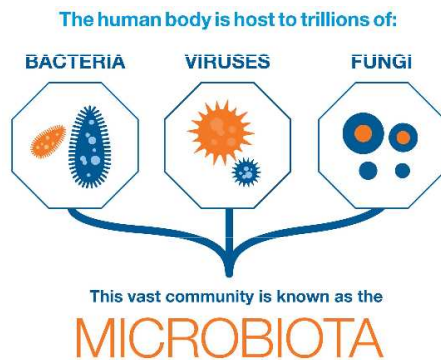
Researchers at ETH Zurich recently identified a previously unknown compartment in mammalian cells. They have named it the exclusome. It is made up of DNA rings known as plasmids. The researchers have published details of their discovery in the journal *Molecular Biology of the Cell*.



# Nukleové kyseliny

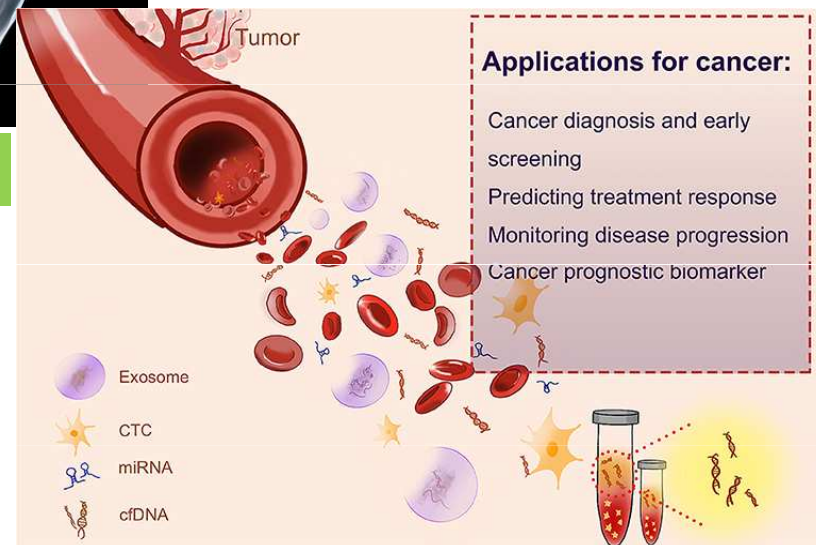


Hostitelské NK/Infekční částice/Mikrobiom



## EXTRACELULÁRNÍ

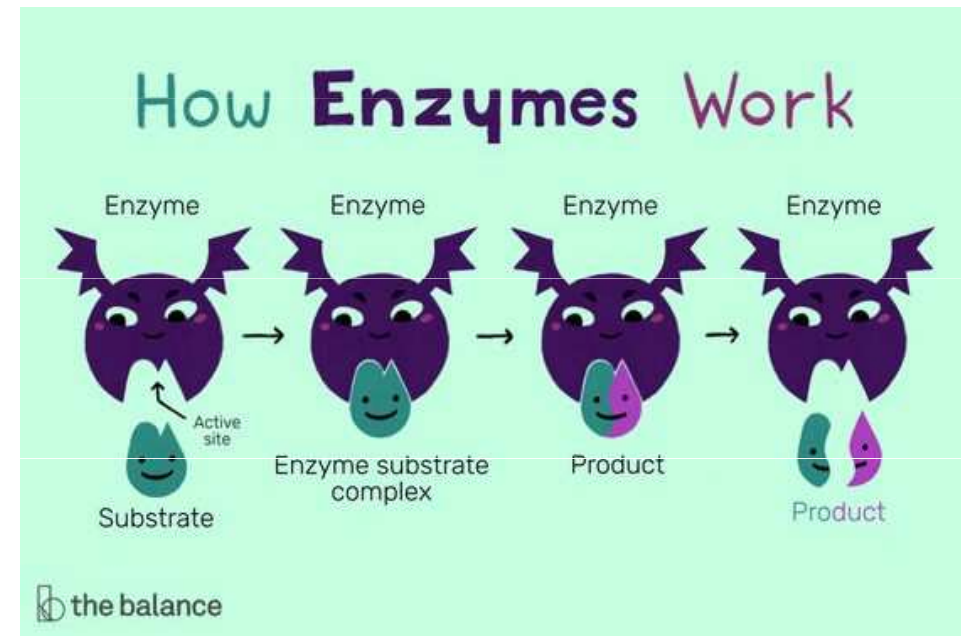
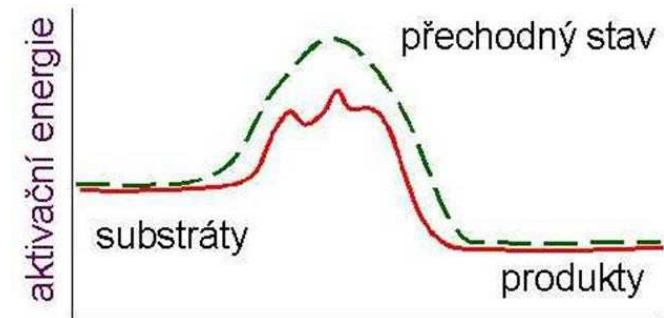
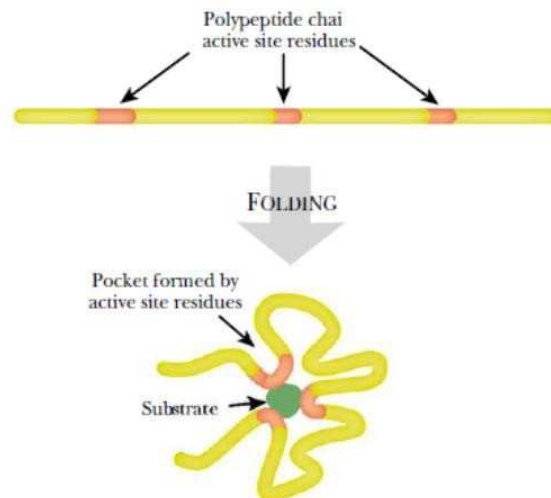
- cirkulující cell-free DNA
- ncRNA
- extracelulární vezikuly
  - exozomy, mikrovezikuly, apoptická tělíska
  - nesou gDNA, mtDNA, RNA, proteiny, lipidy



Liquid biopsy

# Enzymy

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



# Formy výskytu enzymů

- **proenzymy** (zymogeny)
- **izoenzymy**
  - primární
  - sekundární
- orgánově, tkáňově či subcelulárně specifické
- příklady
  - laktátdehydrogenáza, kreatinkináza, ALP

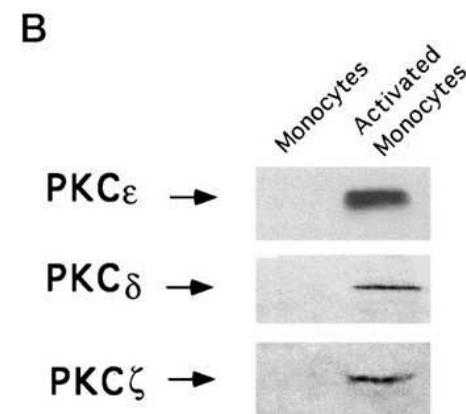
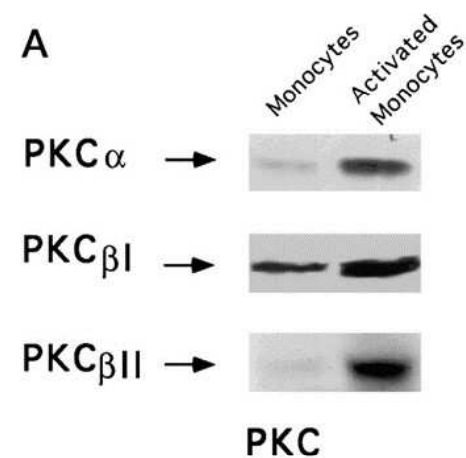
- LD1 (HHHH) - srdeční sval, červené krvinky
- LD2 (HHHM)- monocyto-makrofágový systém
- LD3 (HHMM) - plíce
- LD4 (HMMM) - ledviny, pankreas, placenta
- LD5 (MMMM) - játra

- MM - sval
- MB - srdce
- BB - mozek

- střevní ALP
- placentární ALP
- tkáňová ALP
  - jaterní ALP
  - kostní ALP
  - ledvinná ALP

# Detekce izoenzymů

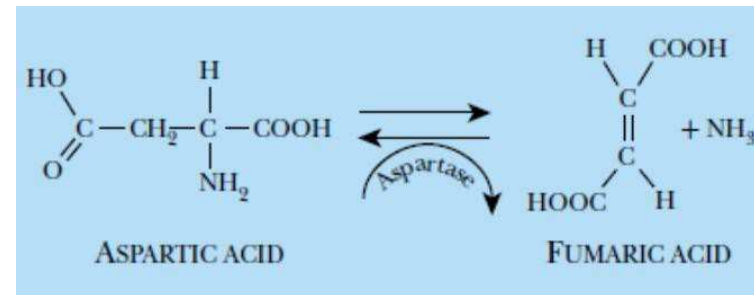
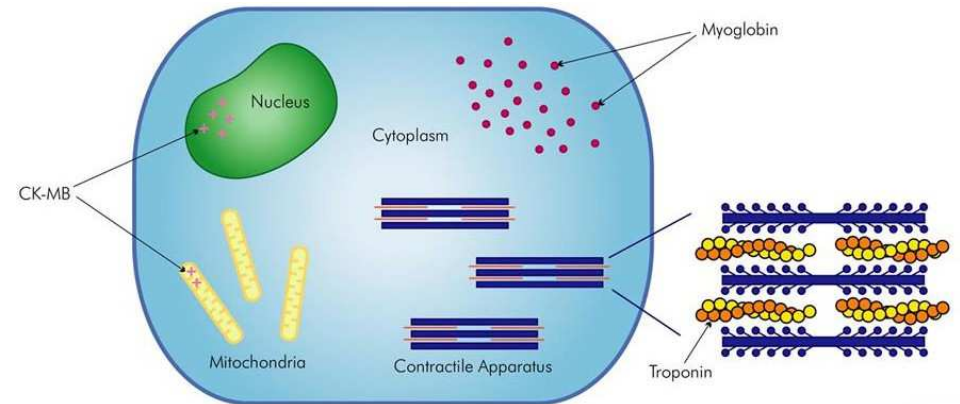
- fyzikálně-chemicky
  - elektroforéza
  - chromatografie
- imunochemicky
- chemicky
  - stanovení reakční rychlosti za různých podmínek – pH, t, c substrátu



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

# 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



# Plazmatické enzymy

## 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

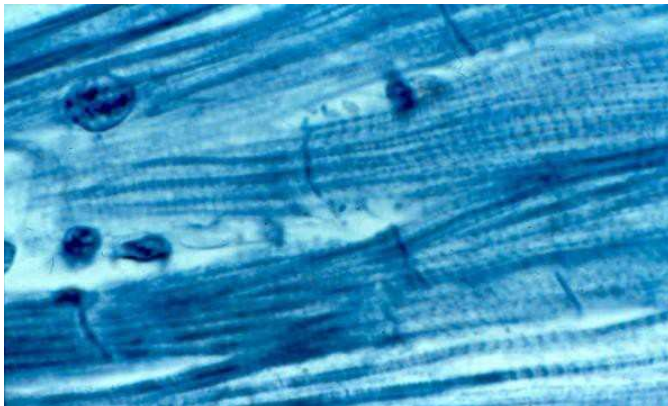
# SRDEČNÍ MARKERY





# Laboratorní diagnostika nekrózy myokardu

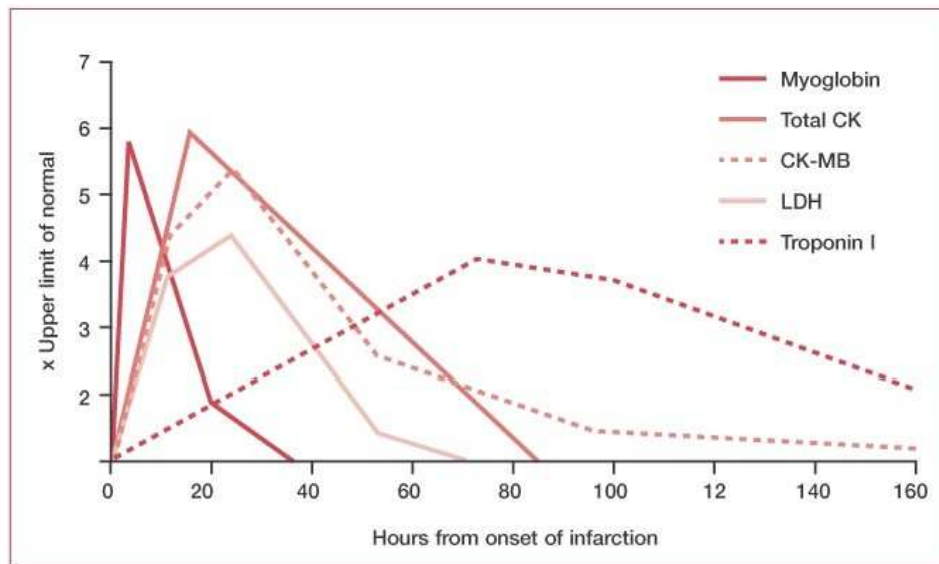
- čím je molekula menší, tím rychleji uvolňována (clearance)
- proteiny vázané na membránu jsou uvolňovány > než cytosolické > vázané na kontraktilní aparát
- specificita pro myokard = troponiny 100%



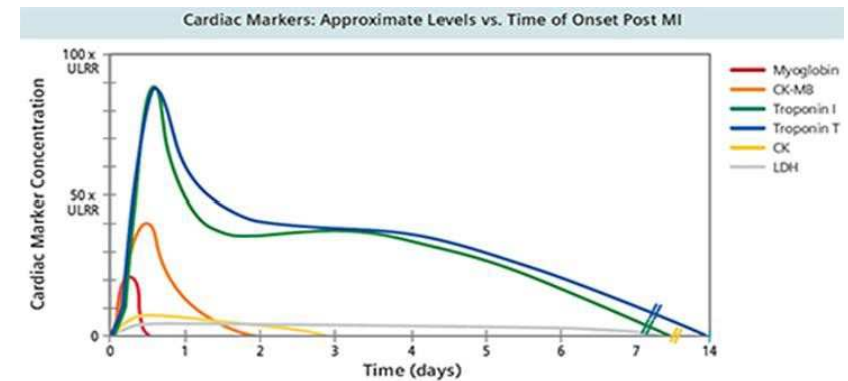
- klasicky
  - myoglobin
  - kreatinkináza (CK)
  - isoenzym CK-MB
  - troponiny I a T (TnI a TnT)
  - aspartátaminotransferáza (AST)
  - laktátdehydrogenáza (LDH)
- nověji
  - heart fatty acid binding protein (HFABP)
  - natriuretický peptid B (BNP)
  - ischemií modifikovaný albumin (IMA)
- ve zkoušení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

# Dynamika srdečních markerů

V prvních hodinách



V horizontu dní



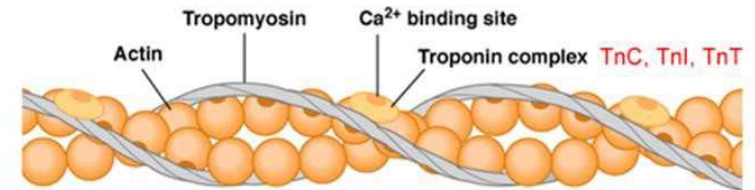
# Srdeční strukturální a funkční proteiny – časná diagnostika IM

## • myoglobin

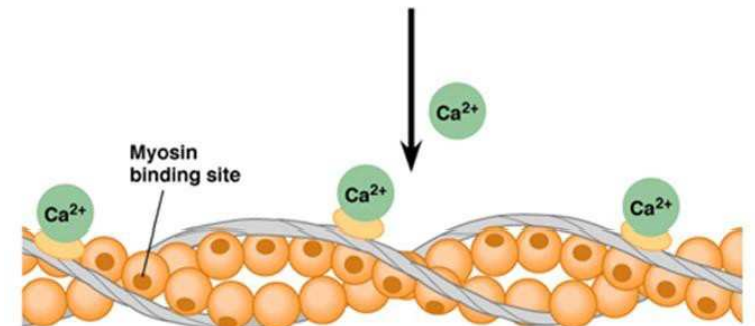
- intracelulární protein srdečních i kosterních svalových buněk účastní se aerobního metabolismu
- při poškození buněk se vyplavuje velmi rychle do krevního oběhu (za 0.5 až 2 h)
- nejmenší ze srdečních markerů (~18kDa) - rychle se zvyšuje a velmi rychle se odbourává (normalizace do 24 hod.)
- vzhledem 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 strukturálně liší od analogické izoformy v kosterním svalu – absolutní kardiospecifita



(a) Myosin binding sites blocked; muscle cannot contract



(b) Myosin binding sites exposed; muscle can contract

# Troponin

## • **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)**

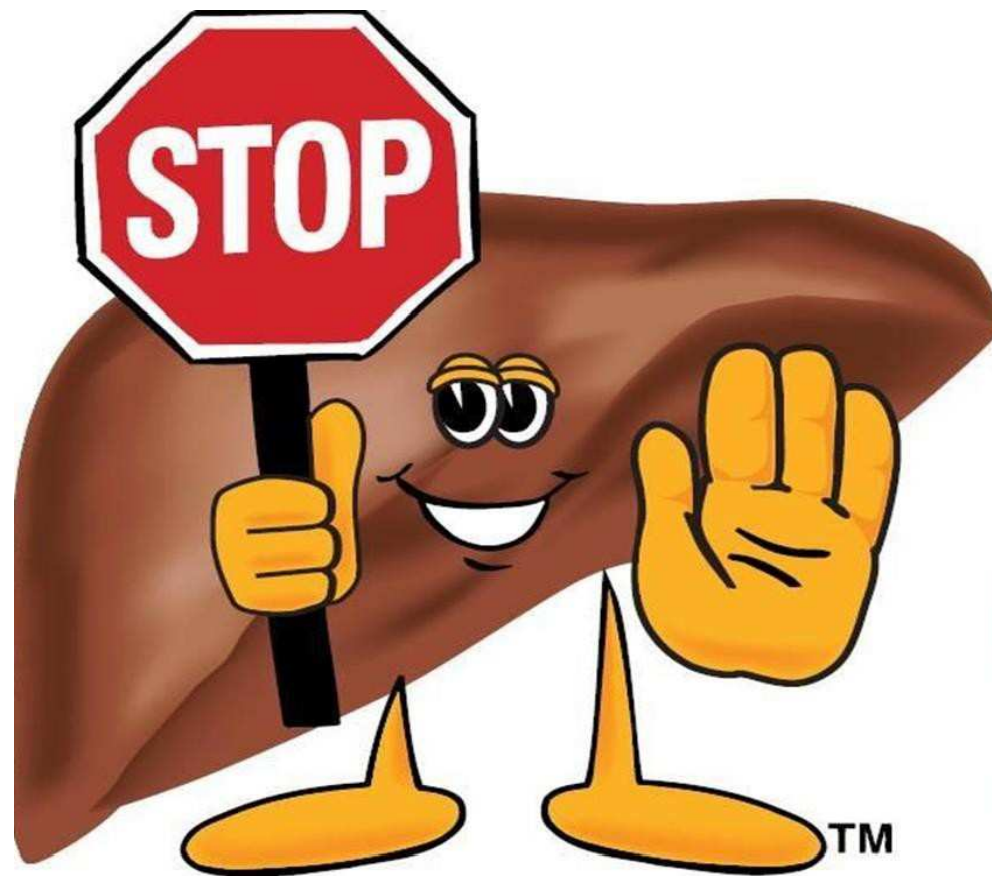
- cytoplazma a mitochondrie
- katalyzuje reverzibilní přenos fosfátu z ATP na kreatin
- $\text{ATP} + \text{kreatin} \rightarrow \text{ADP} + \text{kreatinfosfát}$
- dimer – M (muscle) a B (brain)
- 3 izoformy
  - **CK-BB – hladký sval, mozek, prostata**
  - **CK-MB – myokard (kosterní sval)**
    - 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 maximum
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)

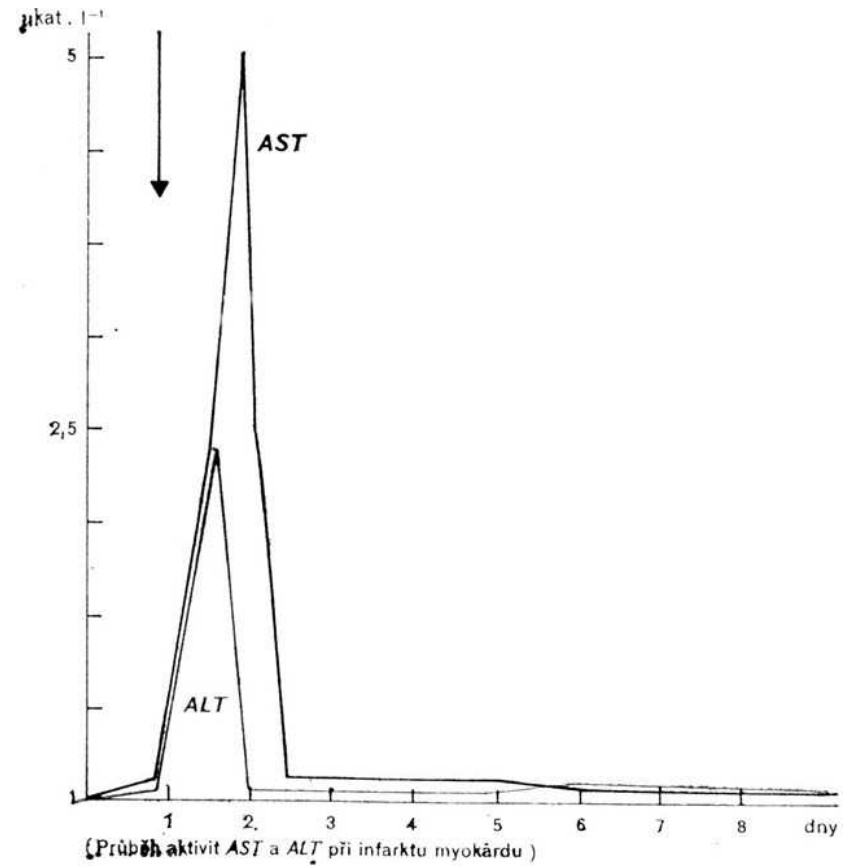
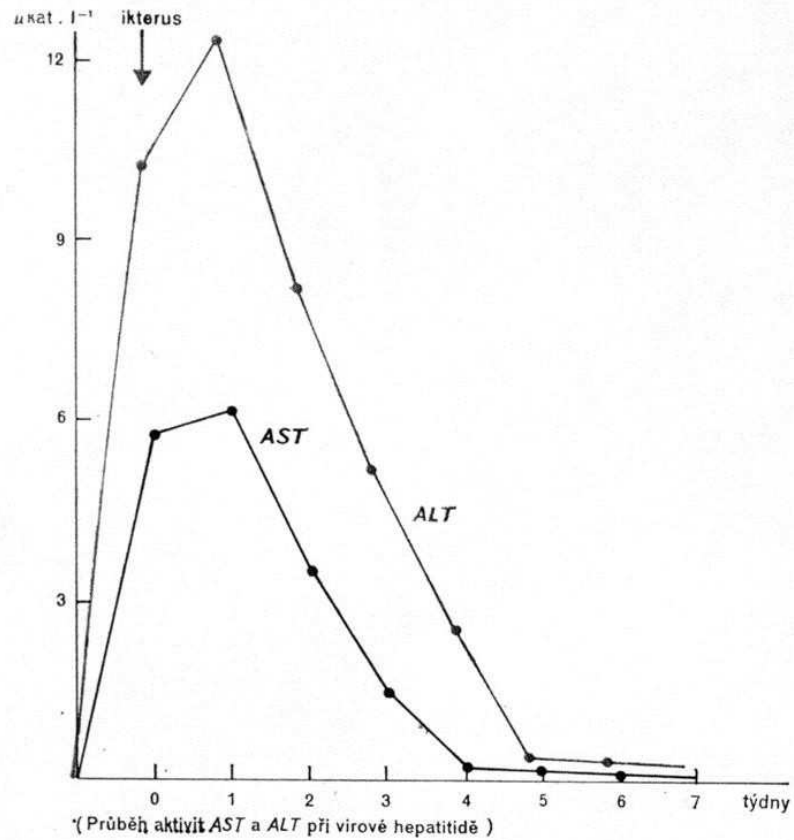
- L-aspartát+2-oxoglutarát → oxalacetát+L-glutamát
- reverzibilní reakce
  - syntéza, odbourávání i přeměna aminokyselin
- cytoplazmatický a mitochondriální izoenzym
- játra, myokard, kosterní sval, ledviny a pankreas
- Uvolnění cytoplazmatického izoenzymu při narušení permeability membrány, uvolnění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

# Příklad





# 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)
- **$\gamma$ -glutamyltransferáza (GMT)**
  - membránový enzym
    - játra, ledvina, pankreas, střevo a prostata
  - katalyzuje přenos  $\gamma$ -glutamyly 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 produkovaný 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



**MUNI**  
**MED**

# Point of care testing (POCT)

- zajišťuje testování v místě péče o pacienta
- rychlá stanovení
  - u lůžka pacienta (centrální příjem, jednotky intenzivní péče)
  - v ordinacích praktických lékařů a specialistů
  - sebetestování chronicky nemocných doma (Near patient testing)
- diagnostické přístroje s jednoduchým ovládáním
  - POCT analyzátory (miniaturizace v klinické diagnostice)
    - zařízení do ruky, stolní analyzátory či zařízení na jedno použití
    - konstruovány pro obsluhu pracovníky bez specializovaného laboratorního vzdělání
    - jednoduchý způsob obsluhy
    - vysoce rozvinutý systém autodiagnostiky
    - minimálními požadavky pro kalibraci, kontrolu a údržbu
  - jednorázové (kvantitativní/kvalitativní) nebo k opakovanému měření
  - plná venózní heparinizovaná krev nebo moč
  - nejčastější testy: parametry acidobazické rovnováhy, glukózu a ionty ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  a  $\text{Cl}^-$ ), kardiální markery (troponin T, myoglobin, NT-proBNP), drogy atd.

# Výhody POCT

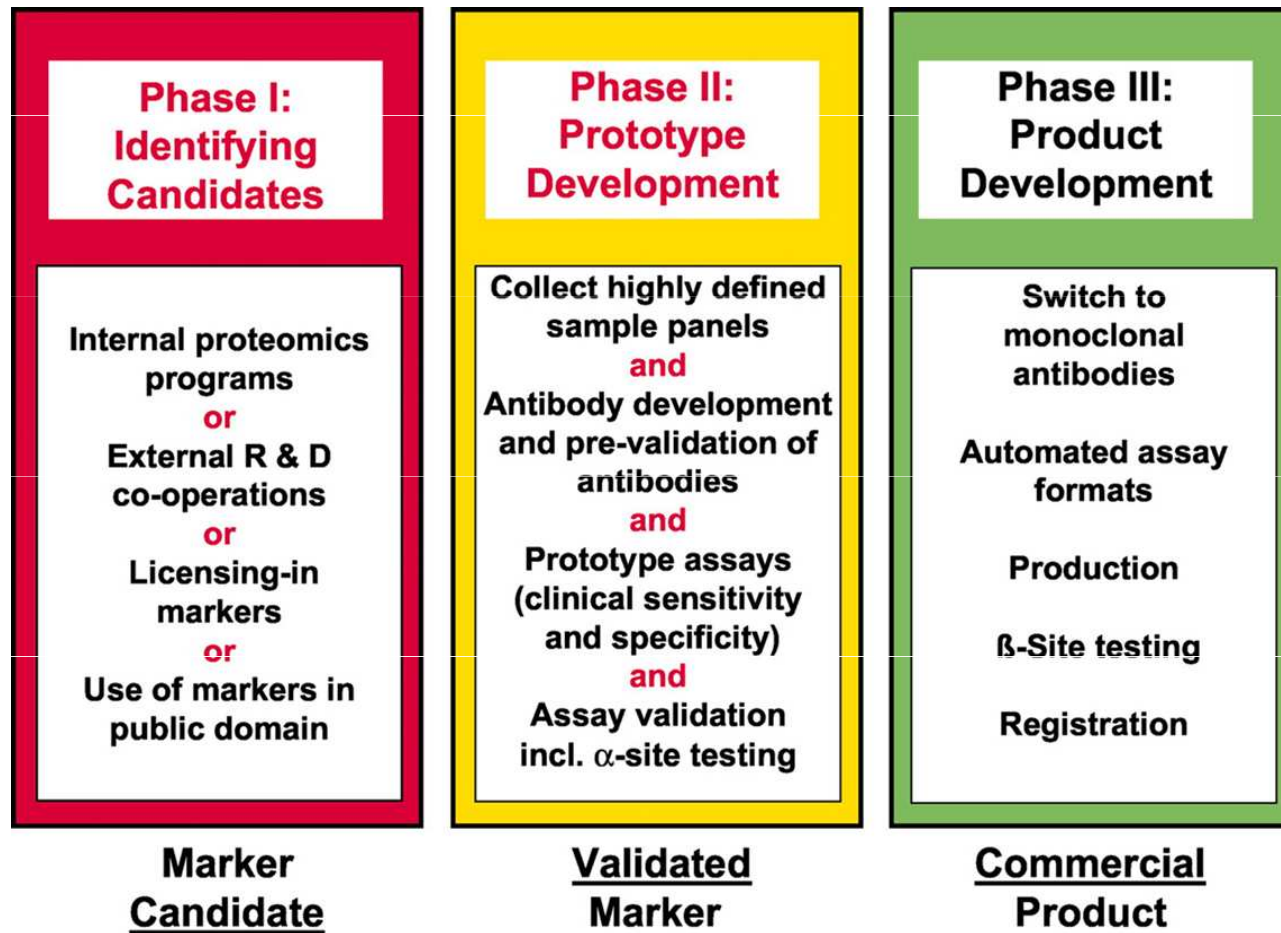
- optimalizace úvodního vyšetření pacienta a cílené odebrání anamnézy
- rychlá analýza z plné nebo kapilární krve (malý objem vzorku)
- získání výsledku v době, kdy se lékař plně věnuje pacientovi
- zkrácení analytického času odezvy (krátká doba čekání pacienta)
- cílená změna péče v případě časného získání výsledku (rychlost může zachránit život)
- možnost zlepšení kvality života pacienta
- malá velikost, snadný transport, snadná instalace, snadná obsluha, minimální údržba
- možnost využití v terénu a v zemích třetího světa

# Nevýhody POCT

- omezené spektrum prováděných testů
- většinou nelze vybrat jednotlivé testy, ale je třeba provádět celý panel vyšetření



# Nové markery



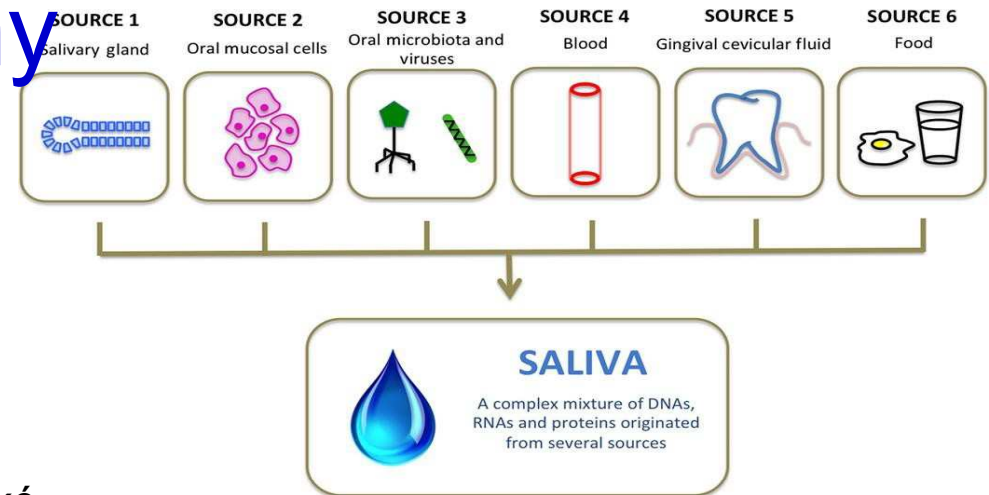


# Molekulární analýza sliny

- Slina jako diagnostické medium
- bohatý rezervoár peptidů, proteinů a NK
- složky slin se prokazatelně mění v reakci na určitá onemocnění a stavy
- více než 100 molekul detekovaných ve vzorcích slin je hodnoceno jako potenciální diagnostické nebo prognostické biomarkery pro různá onemocnění (např. zubní kaz, parodontitida, rakovina, cukrovka)

## – Salivaomika

- pojem zaveden 2008
- spojuje znalosti o různých „omických“ složkách sliny (proteom, transkriptom, metabolom, mikrobiom, ...)
- využívá high-throughput technologie (genomika, transkriptomika, proteomika, metabolomika, lipidomika a mikrobiomika, ...)
- analýza sliny → **identifikace biomarkerů**





# Molekulární analýza sliny

## – Slina jako diagnostické medium

### Výhody:

- odběr neinvazivní, snadný, bezbolestný, opakovatelný (trvalá dostupnost materiálu), i nevyškolený personál, lze u všech věkových kategorií
- vzorek o velkém objemu, stabilní v čase, zpracování rychlé, levné
- potenciál nahradit krev při screeningu, diagnostice a prognóze onemocnění

Table 1. Description of Human Saliva Collection Methods.

Type of Whole Mouth Fluid	Method of Collection and Type of Collection Device
Whole Saliva (WS)	Patients should refrain from eating, drinking, and oral hygiene procedures for at least 1 h before saliva collection. (Optimum collection time is 8–10 a.m.). Before collection perform a 1 min oral rinse with distilled water and then after 5 min collect ~5 mL of saliva. Collected sample must be processed in the laboratory within 1 h.
Unstimulated Whole Saliva (USWS)	Passive drooling: In this method restrict oral movement and drain saliva from the lower lip into a plastic vial. Spitting method: Instruct subject to spit into a collection vial. In this method 14 times more bacterial contamination is introduced into the sample.
Stimulated Whole Saliva (SWS)	For the stimulation of glands, chewing different things like natural gum, a piece of paraffin wax, citric acids, and powdered drink crystals have been used.
Parotid Gland	Method introduced by Carlson and Crittenden (1910). In this method a double chambered metallic cup with two outlet tubes is used. One end holds the cup in place using vacuum suction. The second half acts as a collection vehicle for saliva. Specimen collection can be enhanced by smearing citric acid (10%; 1 mL) on the dorsum of tongue every 30 s. Discard the first 1.5 mL of saliva prior to sample collection.
Submandibular/Sublingual Gland	Truelove, Bixler, and Merrit (1967) used a "V"-shaped collector. This method is similar to that for parotid gland collection, but in this case the initial 2 mL is discarded.
Minor Glands	Kutscher <i>et al.</i> (1967) used capillary tubes for collecting saliva from minor glands located at the everted surface of the lower lips.

<https://doi.org/10.3390/ijms17060846>

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008058>

MUNI  
MED

# Molekulární analýza sliny

→ otázka validace biomarkerů pro klinické aplikace

## – Slina jako diagnostické medium

### Limitace:

#### – korelace hladin biomarkerů sérum/slina

↓↓↓ koncentrace analytů v porovnání se sérem → ↑ objem vzorku slin, detekční limit metody, deplece abundantních proteinů (PRPs, α-amyláza, albumin, muciny and sekreční IgA mohou tvořit až 80 %), osmolalita

#### – vysoká variabilita → horší reprodukovatelnost výsledků

- technická (odběr, zpracování, použitá metoda)
- inter- (věk, pohlaví, fyziologický stav) a intraindividuální (cirkadiánní, cirkanuální)
- biologická (vliv stavu dutiny ústní, cirkadiánní rytmus, systémová onemocnění (Sjögrenův syndrom), léčiva, chemo/radioterapie) → objem a složení slin
- rychlost a stimulace toku slin → koncentrace slinných biomarkerů
- proteolytické enzymy (mikrobiom/hostitel) → stabilita určitých biomarkerů

#### – otázka standardizace

→ vztažení proteinových markerů k celkovému proteinu sliny (stejná osoba jako vzorek i kontrola)

→ standardizace používaných metod, validace protokolů

→ zohlednění všech proměnných (variabilita složení, místo odběru, rychlost toku, objem vzorku, stimulace, kontaminace krví, odběrové soupravy, integrita analytu)

- **verifikace** → stanovení biomarkeru různými technikami, dosažení podobných výsledků
- **validace** → preklinická → definitivní akademická (prospektivní odběr vzorků, retrospektivní evaluace) → multicentrické studie

# Molekulární analýza sliny

## – Slina jako diagnostické medium

### Tekutá biopsie (liquid biopsy)

- u nádorových onemocnění
- nahrazují tradiční tkáňovou biopsii
- testy detekují:
  - cirkulující nádorové buňky
  - exomy
  - nádorovou DNA, nádorovou RNA a proteiny (šíření do krevního řečiště nebo slin z primární léze)

Table describing examples of commonly analyzed biomarkers in whole mouth saliva; CRP – C-reactive protein; HPLC – high performance liquid chromatography; IC – ion chromatography; LC-MS – liquid chromatography mass spectrometry; MALDI-TOF MS – matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry; RT-LAMP – reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification; AOPP – Advanced Oxidation Protein Products; TBARS – Thiobarbituric Acid Reactive Substances; TAC – Total Antioxidant Capacity; FRAS – Free Radical Analytical System.

Group of molecules	Biomarkers	Method
Cytokines	Interleukins Tumor-necrotising factor Interferons, Chemokines	Multiplex array Luminex fluoresce technique
Acute phase proteins	CRP	ELISA
Inflammatory proteins	Myeloperoxidase Neutrophil elastase	ELISA
Antibodies	Anti-HIV, Anti-RO Anti-La	RT-LAMP ELISA
Hormones	Testosterone Estradiol Cortisol	ELISA HPLC
Enzymes	Amylase Lysozyme	ELISA MALDI-TOF MS
Proteins-polypeptides	Immunoglobulin A Lactoferrin	MALDI-TOF MS ELISA
Nucleic acids	DNA methylation DNA mutations microbiome	Microarray Sequencing
Vitamins	25(OH)D(3) vitamins A, C, E	LP-MC ELISA
Ions	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Cl <sup>-</sup> , Ca <sup>2+</sup> , NH <sub>3</sub> <sup>-</sup>	IC
Oxidative stress	AOPP TBARS	Spectrophoto- Spectrofluorometric methods ELISA
Antioxidant status	TAC FRAS	Spectrophoto- Spectrofluorometric methods ELISA

Janšáková et al.,  
Klin. Biochem. Metab., 26 (47), 2018, No. 1, p. 21–26

<https://doi.org/10.1007/978-3-030-37681-9>

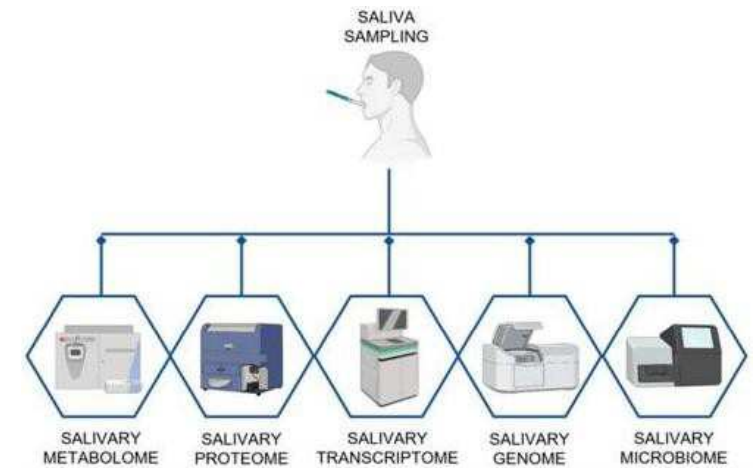
MUNI  
MED

# Molekulární analýza

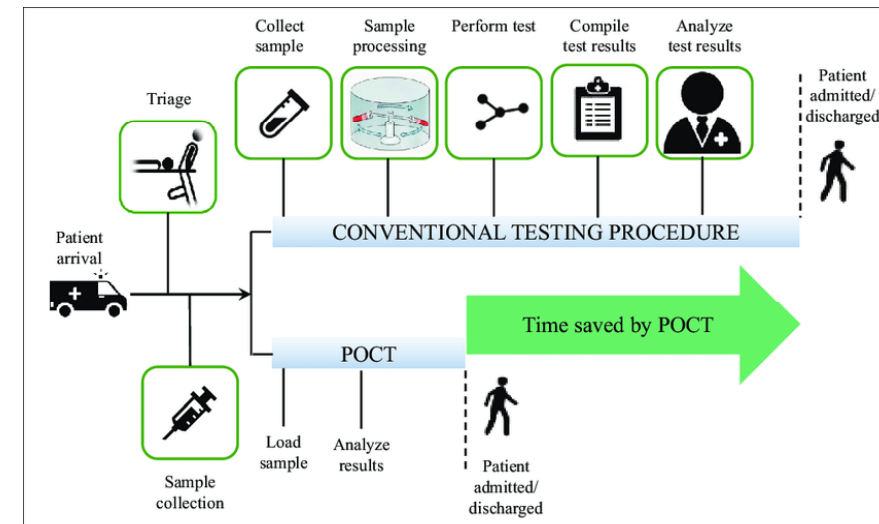
## – sliny jako diagnostické medium

### „Omiky“

- **DNA** (genomika a epigenomika - rakovina)
- **RNA** (transkriptomika - biomarkery pro chronickou parodontitidu, Sjögrenův syndrom, rakovinu plic, vaječníků, prsu a slinivky)
- **proteiny** (proteomika - Sjögrenův syndrom, Downův syndrom, schizofrenie)
- **metabolity** (metabolomika – rakovina ústní dutiny, hepatocelulární a kolorektální karcinomy, parodontitida, chronické onemocnění ledvin)
- **lipidy a mikrobiom** (lipidomika, mikrobiomika)...
- souběžná analýza stovek analytů → přesná detekce malých změn
- vysoká citlivost, kvantitativní výsledky
- analýza souboru biomarkerů pro dané onemocnění
- zatím žádná v klinické aplikaci → snahy o „**point-of-care**“ testování



<https://doi.org/10.3390/bios11100396>



MED

<https://doi.org/10.1007/978-3-030-37681-9>

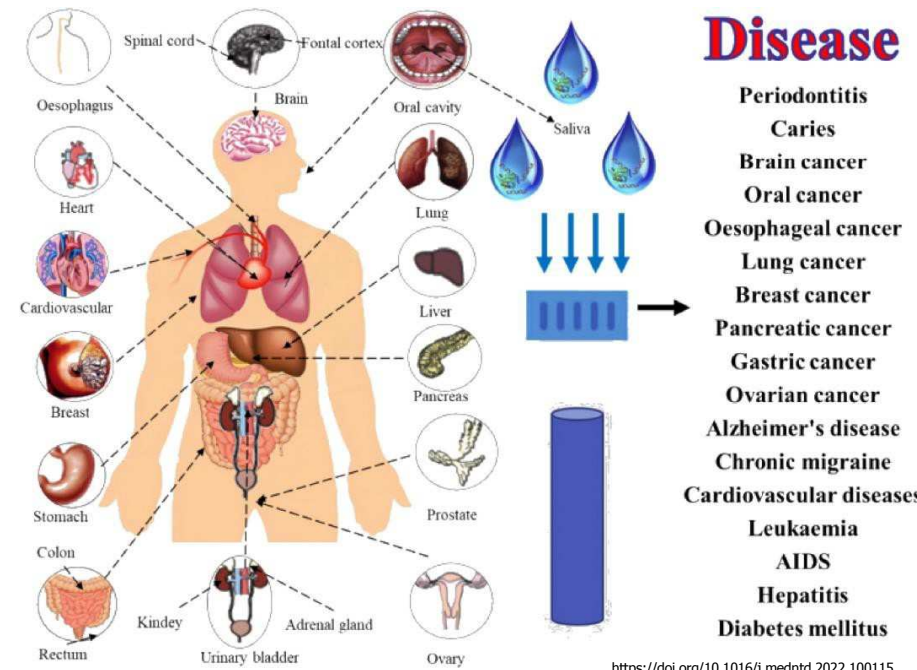
# Molekulární analýza sliny

- Slina jako diagnostické medium – zubní kaz
  - žádný diagnostický test
  - testy náchylnosti k zubnímu kazu → mikrobiologická laboratoř
    - stanovení přítomnosti kariogenní mikroflóry
    - kvantitativní určení přítomnosti fermentujících mikroorganismů ve slině
    - stanovení pufrovací kapacity slin a rychlosti sekrece slin
    - kvantifikace kolonií plísně *Candida albicans*
- snahy o vztažení prevalence zubního kazu k fenotypu určeném ze sliny → rozporuplné výsledky

# Molekulární analýza

## Slina jako diagnostické medium –biomarkery onemocnění

- autoimunitní onemocnění  
Sjögrenův syndrom –  $\alpha$ -amyláza, karbonická anhydráza VI, laktoferin,  $\beta$ 2-mikroglobulin
- neurodegenerativní onemocnění  
Alzheimerova choroba – celkový tau protein, fosforylovaný tau protein, amyloid- $\beta$  a alfa-synuklein
- genetické onemocnění  
cystická fibróza – Ca,  $PO_4^{2-}$ , Na, K, Cl, ↓ objem slin, močovina, kyselina močová, prostaglandin  $E_2$
- rakovina  
spinocelulární karcinom – IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-1, VEGF, HER2, tissue polypeptide antigen (TPA) and EGFR, LDH, N- $\alpha$ -acetyltransferase 10 protein (Naa10p), carcinoembryonic antigen (CEA) protein, serum basic fibroblast growth factor (bFGF), transferin, cyklin D, Maspin, specifické mRNA  
r. prsu - HER2/neu (C-erbB-2), VEGF, EGF, specifické mRNA, autoprotilátky proti HER2 a MUC-1  
r. slinivky – transkriptomické markery mRNA (*KRAS*, *MBD3L2*, *ACRV1* a *DPM1*), specifické miRNA, laktoperoxidáza, Cyklofilin B, Cytokeratiny (14, 16 a 17)
- alergie  
potravinová alergie - IgE a IgG<sub>1</sub>





# Molekulární analýza

## biomarkery onemocnění

### – kardiovaskulární onemocnění

CK-MB, myoglobin, troponin I, myeloperoxidáza, markery zánětu (CRP, TNF- $\alpha$ , MMP-9), markery adheze (rozpuštěný CD40 a ICAM-1)

### – metabolismus

diabetes melitus 2. typu – 1,5-anhydroglucitol, CRP, leptin, IL-6, TNF- $\alpha$

### – infekční onemocnění

HIV – protilátky proti HIV

viry – přítomnost protilátek IgM/IgA, virová RNA

Kandidóza, amébiáza – přítomnost *Candida* sp., *Entamoeba histolytica* (protilátky)

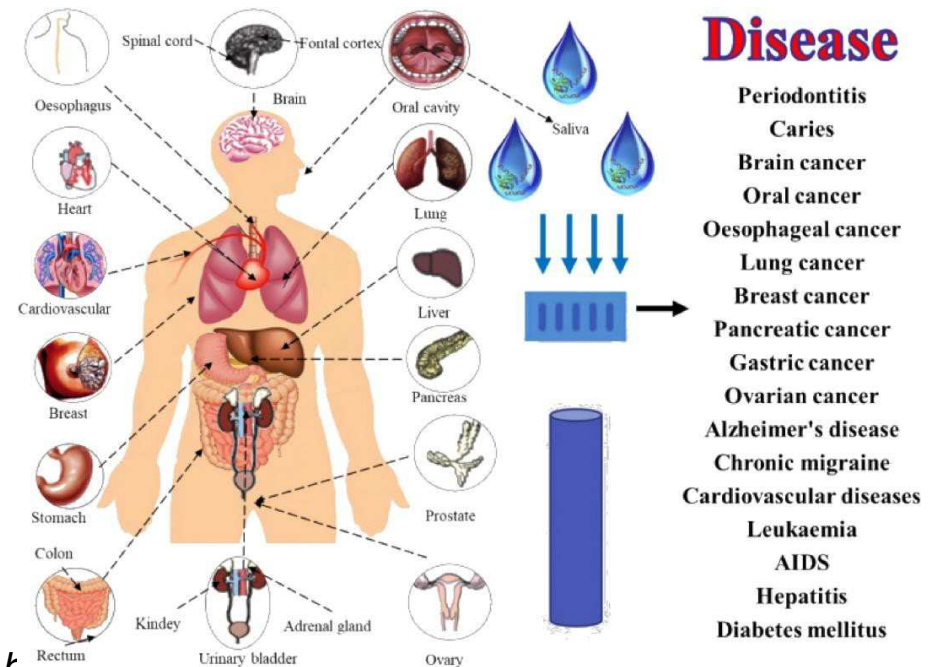
Hepatitida – přítomnost DNA viru HBV

Peptidické vředy, gastritida, – přítomnost *Helicobacter pylori* (IgG protilátky, DNA *H. pylori*)

### – hormonální nemoci

Cushingův syndrom a Addisonova choroba – kortizol

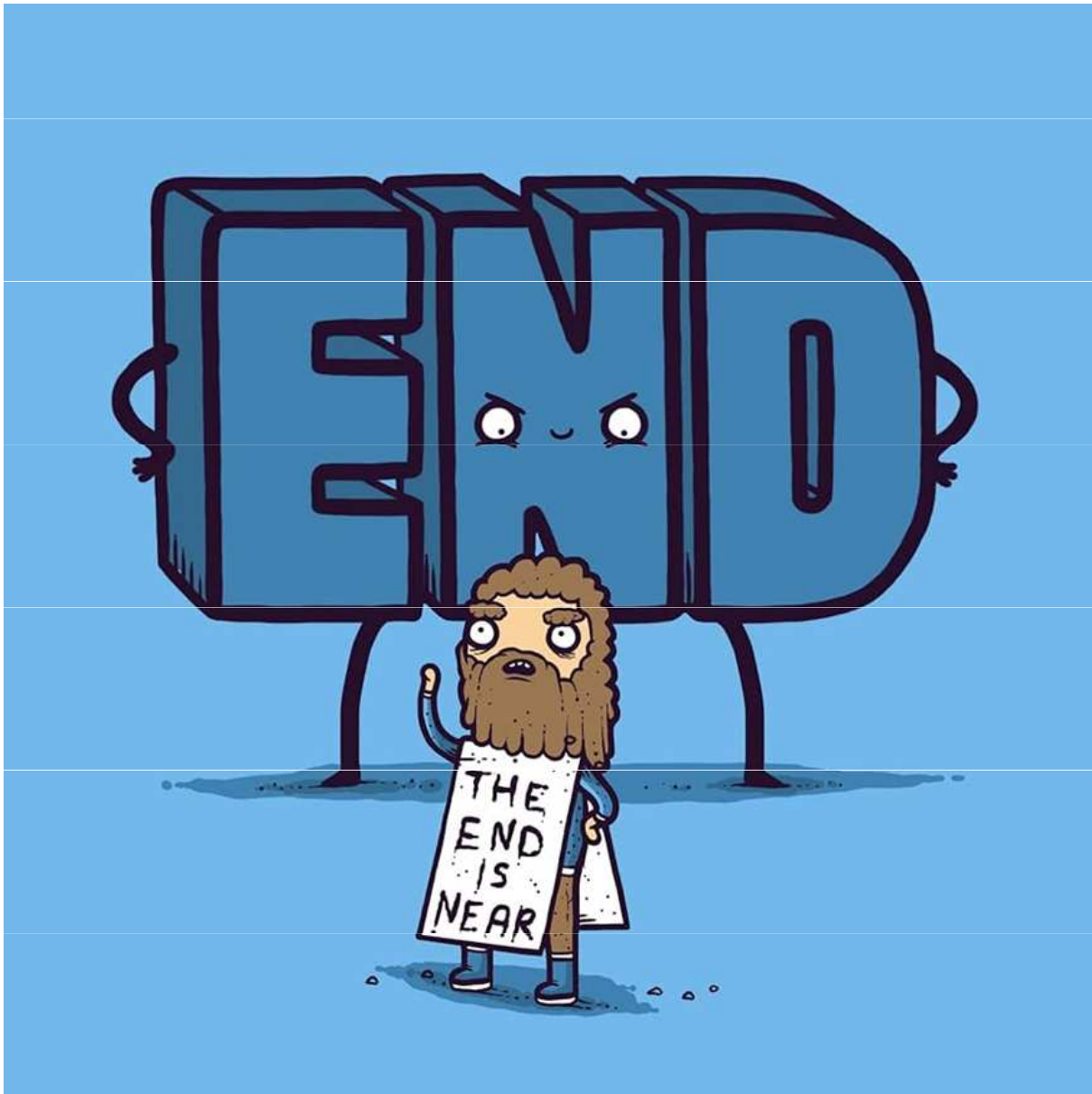
pohlavní hormony – syndrom polycystických ovarií, menopauza/andropauza, anovulace, hypogonadismus, hyperestrogenismus



<https://doi.org/10.1016/j.medntd.2022.100115>

doi:10.7759/cureus.7708

MUNI  
MED



MUNI  
MED