

MUNI
PHARM

Klinická biochemie 2024 (4)

Ústav farmakologie a toxikologie
Farmaceutická fakulta
MU, Brno
Ing. Michal Karpíšek, PhD

michal.karpisek@email.cz

Genetika alias DNA diagnostika

Polymorfismus vs. mutace – o polymorfismu se mluví pokud frekvence příslušné změny (změn) genu v populaci $> 1\%$

Polymorfismus genů – hlavní předmět farmakogenetiky (nejznámější případ: rychlá a pomalá acetylace antituberkulotika isoniazidu, nejjednodušší varianta je Single Nucleotide Polymorphism = SNP) = 90% z odhadovaných 10-15 miliónů polymorfismů – testování pomocí DNA čipů

Monogenní genetické choroby jsou důsledkem mutací, jejich ovlivnění vnějším prostředím bývá minimální. Databáze **OMIM** (Online Mendelian inheritance in man), přístupná na adrese

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM> , obsahuje v

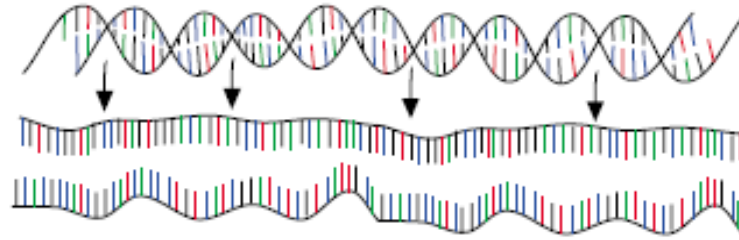
současnosti přes 5000 popsaných monogenních chorob.

Základní používané analytické metody:

- RFLP (restriction fragment length polymorphism)
- FISH (fluorescent in situ hybridization)
- RTqPCR (Real Time qPCR)
- NGS (Next Generation Sequencing)

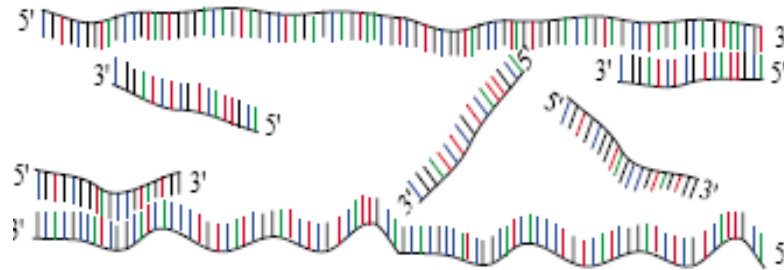
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

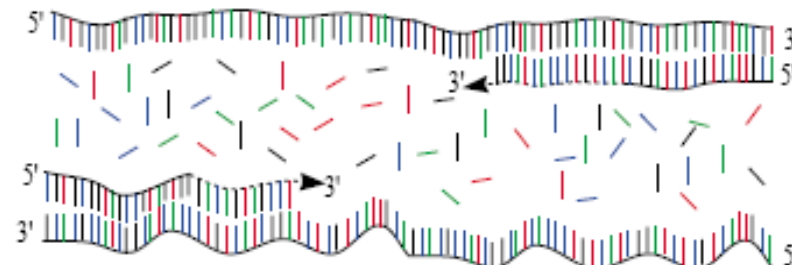
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



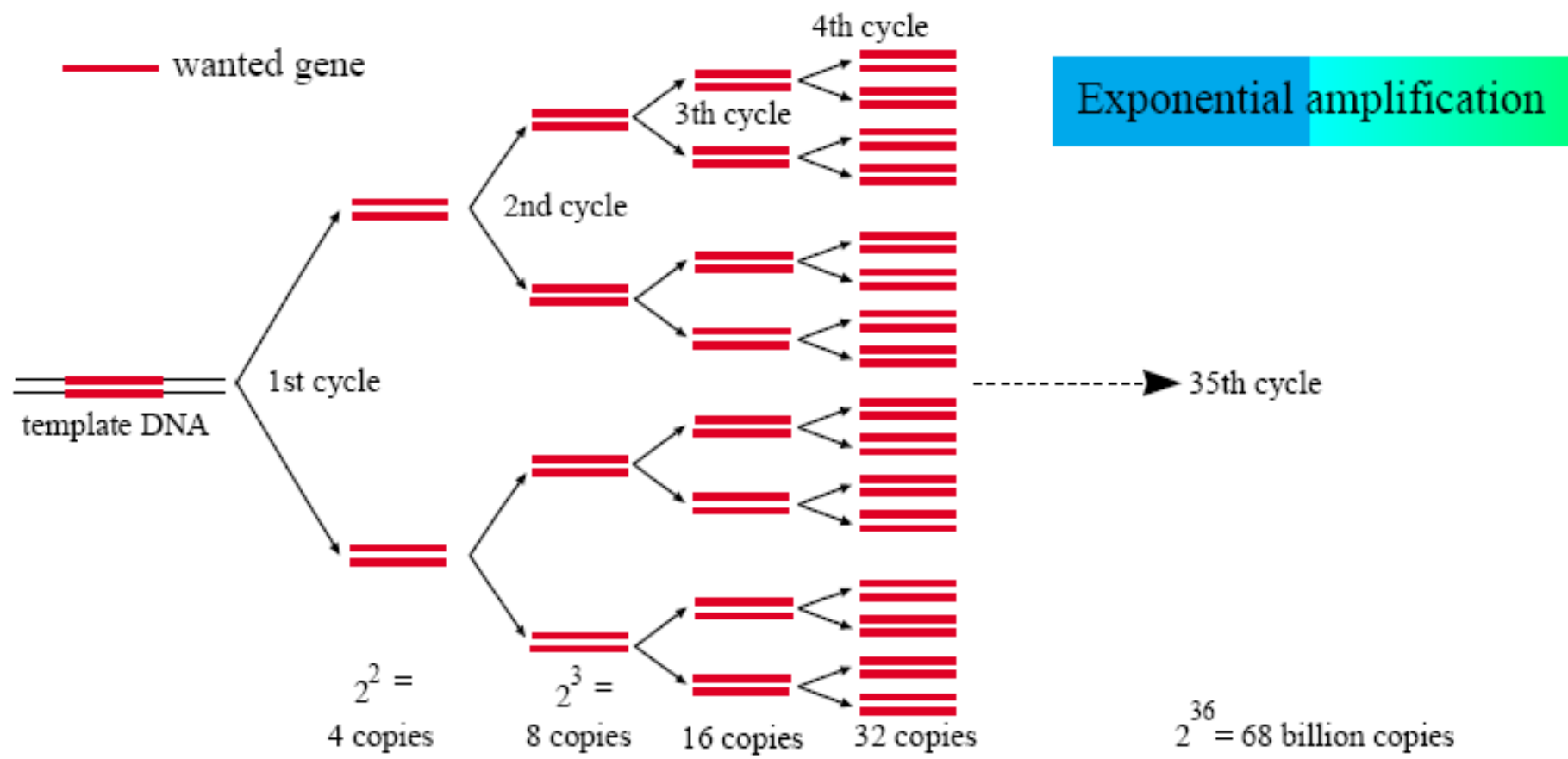
Step 3 : extension

2 minutes 72 °C

only dNTP's

nasednutí
primerů

působení
polymerázy



Výsledek: 68 miliard kopií

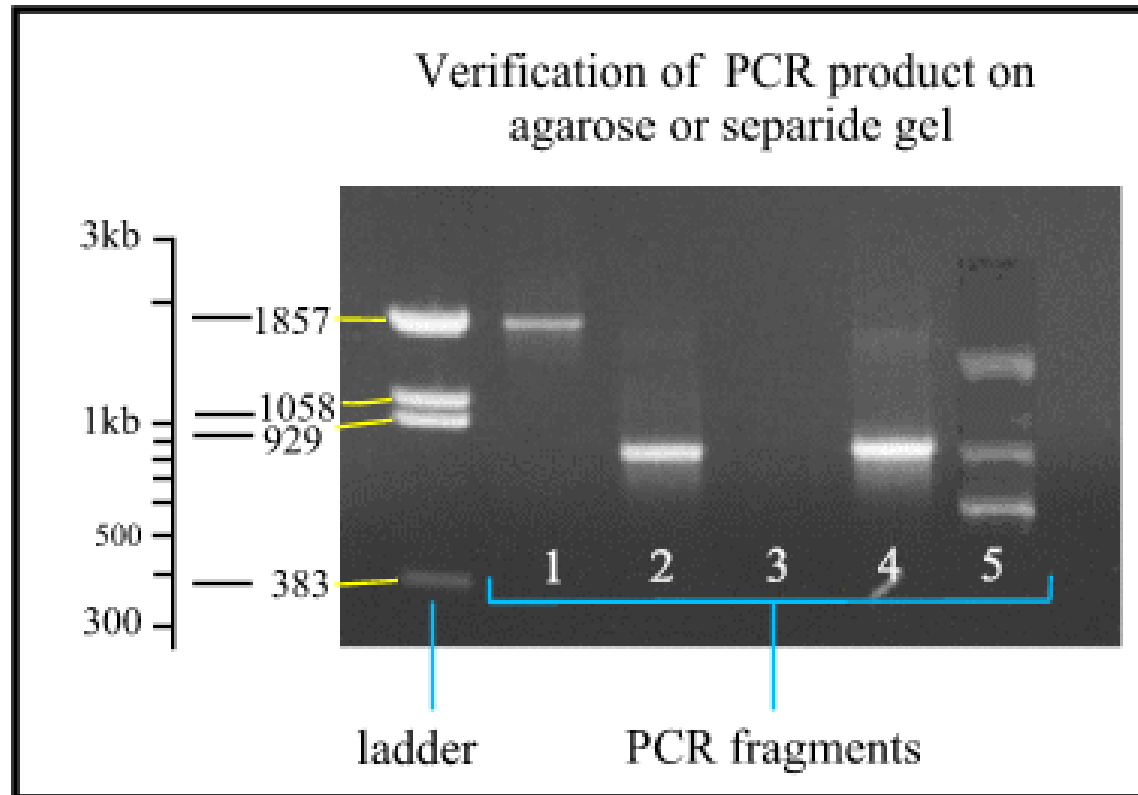
PCR:

2 primery (= oligonukleotidy)

PCR je metoda specifického znásobení (amplifikaci) genetického materiálu, specifita je definována volbou primerů

Přístrojové vybavení: termocycler – zajišťuje programovanou změnu teplot

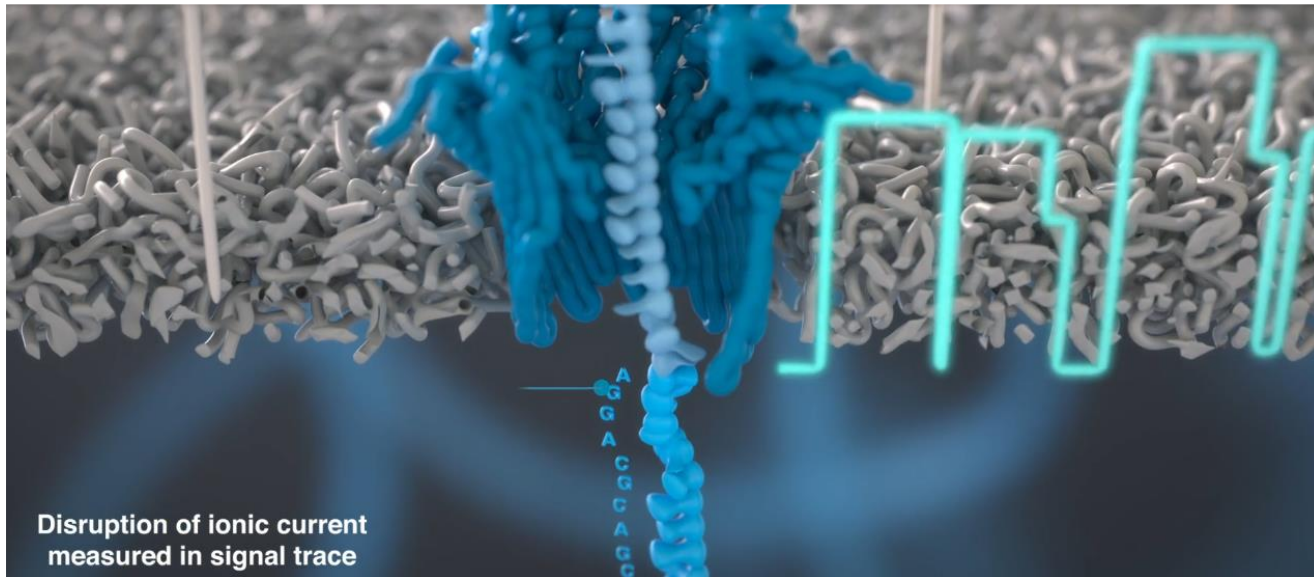
Produkt PCR je dále analyzován (detekován) elektroforézou v agarózovém gelu, detekce NK např. ethydiumbromidem



ladder = standard, 1-5 = vzorky, 3 – gen (resp. jeho fragment) není přítomen ve vzorku, 5 – nespecifické primery

- RFLP (restriction fragment length polymorphism)
- FISH (fluorescent in situ hybridization)
- qPCR <https://www.youtube.com/watch?v=LBrVspSqDj4>
- **NGS**

<https://nanoporetech.com/platform/technology>



Příklady často sledovaných mutací u onkologických onemocnění: KRAS, NRAS, BRAF, EGFR, TP53

Neonkologická onemocnění:

- **Fenylketonurie** (porucha odbourávání fenylalaninu na tyrosin (nefunkční enzym fenylalaninhydroxylasu), v krvi se hromadí i jiné produkty - kys. fenylmléčná, fenylpyrohroznová a fenylloctová
- **Hemochromatóza** (zvýšeném vstřebávání železa z trávicího traktu a jeho nadměrné ukládání v játrech, pankreatu, srdeční svalovině, kůži (spolu s melaninem), v pohlavních žlázách, v 80% případů se jedná o mutaci C282Y nebo H63D (gen HFE, protein ovlivňuje vazbu transferinu na receptor transferinu), zdravý vstřebává 10-20mg Fe denně z potravy, nemocný až 40mg,
- **Familiární hypercholesterolémie** (mutace v genu pro receptor pro některý z apolipoproteinů, nejčastěji ApoB → porucha metabolismu lipoproteinů)

– Určování rodičovství

komerčně nejúspěšnější: cena cca 5000Kč, testuje se 16 různých genů

– Trombofilní mutace

mutace genů *F5* a *F2*, které ovlivňují složení a funkci dvou bílkovin: faktoru V a faktoru II

Leidenská mutace (FV Leiden)

Mutace genu pro srážlivý faktor II (FII protrombin)

zvýšená srážlivost krve i u heterozygotů!

– Cystická fibróza (CF)

U zdravých lidí jsou buňky dýchacího a zažívacího traktu pokryty řídkým, tekutým hlenem, u lidí postižených cystickou fibrózou (CF) jsou pokryty hlenem velmi hustým a viskózním (přibližně 10x hustším než u zdravých lidí).

Důsledkem je, že z plic nemohou být řádně a rychle odstraněny částičky prachu a bakterie. Tyto zadržené nečistoty způsobují dýchací obtíže a záněty s následným těžkým poškozením plic.

Výskyt v populaci: u 1 z 3000 dojde k rozvoji onemocnění (především v dětství ale i dospělosti), ale výskyt mutace genu CFTR (defekt CFTR je příčina CF) je mnohem častější – každý 25. člověk. Mutace může být zjištěna různých místech genu, ale 70% nemocných má mutaci „Delta F508“, kdy chybí triplet CTT (chybí fenylalanin v poloze 508, protein CFTR má 1480 aminokyselin). Delta F508 + 5 dalších mutací pokrývá 90% všech případů.

CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) je gen lokalizovaný na chromozomu 7, funkčně je to chloridový kanál. Jde o autosomálně recesivní onemocnění. Diagnostika – i prenatálně.

Klinické projevy: časté infekce plicního epitelu, sípavé a zrychlené dýchání, ucpávání žlučovodu, malabsorbce, infekce slinivky, u dětí výrazně slaný pot

M U N I

Kardiovaskulární systém

P H A R M

Patofyziologie CVS

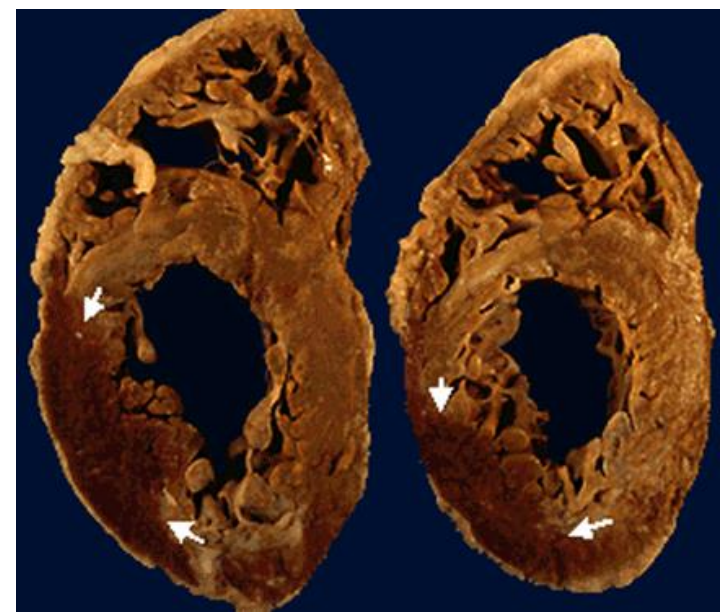
- ischemická choroba srdeční (diagnostika pomocí biochem. markerů)**
- kardiomyopatie**
- srdeční arytmie**
- vrozené onemocnění**
- dysfunkce endotelu**
- hypertenze**

Běžné diagnostické postupy zahrnují: EKG (elektrokardiografie), ECHO (echokardiografie), CT, NMR, koronarografie ...

Nejvýznamnější z hlediska klinické biochemie je Ischemická Choroba Srdeční (ICHS)

- zahrnuje infarkt myokardu s elevací (i bez elevace) úseku ST na EKG, nestabilní angina pectoris a chronické formy ICHS
- nedostatečné zásobování srdce krví - hypoxie - nekróza
- metabolismus: 35% objemu kardiomyocytů jsou mitochondrie, e: ATP se tvoří betaoxidací MK a následnou ox. fosforylace, hlavní energ. zdroj: FFA (70%), glukosa, ketolátky

AIM (akutní infarkt myokardu, Acute Myocard Infarction = AMI)



– chronické srdeční selhání (

- jedná se o selhání srdce jako pumpy – nedostatečné prokrvení periferních orgánů
- hlavní příčiny **levostranného srdečního selhání**: ICHS, chlopenní vady, těžká hypertenze
- hlavní příčiny **pravostranného srdečního selhání**: nejčastěji plicní onemocnění (např. CHOPN, ARDS), plicní embolie
- klasifikace: NYHA (I bez omezení.....IV omezení i v klidu, dušnost)

Ischemická CHoroba Srdeční (ICHHS)

Biochemické testy

enzymy: kreatinkináza, laktátdehydrogenáza,
neenzymové: toponin, myoglobin

Ischemická CHoroba Srdeční (ICHS)

Biochemické testy

enzymy: kreatinkináza, laktátdehydrogenáza,

Neenzymové: toponin, myoglobin

Kreatinkináza (CK)

3 cytosolické izoenzymy : CK-1 (BB), CK-2 (MB), CK-3 (MM) a 1 mitochondriální (CK-Mt), 3 geny kódují podjednotky CK-M, CK-B a CK-Mt

Výskyt: kosterní svalstvo, srdce, mozek

Diagnosticky nejvýznamější: **celkový CK, CK-2 (CK-MB)**

CK je důležitý parametr pro stanovení dg. AIM

Kreatinkináza (CK)

3 cytosolické izoenzymy : CK-1 (CK-BB), CK-2 (CK-MB), CK-3 (CK-MM) a 1 mitochondriální (CK-Mt), 3 geny kódují podjednotky CK-M, CK-B a CK-Mt

Diagnosticky nejvýznamější: **celkový CK, CK-2 (CK-MB)**

Ačkoli CK-MM je nejvíce zastoupenou formou CK v srdečním i kosterním svalstvu, CK-MB je mnohem více specifický pro buňky srdečního svalu

- srdce: CK-MB tvoří 10-20% celkového CK
- kosterní sval: CK-MB tvoří 2% celkového CK



AIM: zvýšení celk CK +
zvýšení % CK-MB

Nespecifické při diagnostickém hodnocení na základě pouze celkové CK – v důsledku poškození kosterního svalstva vzroste konc. celkového CK,

ALE % zastoupení CK-MB se nemění (do 2% hodnoty celk. CK)!!

U AIM je kvantitativní stanovení CK-MB nutností, hrozí „překrytí“ v důsledku poškození kosterního svalstva (sportovci, úraz nebo pád pacienta)

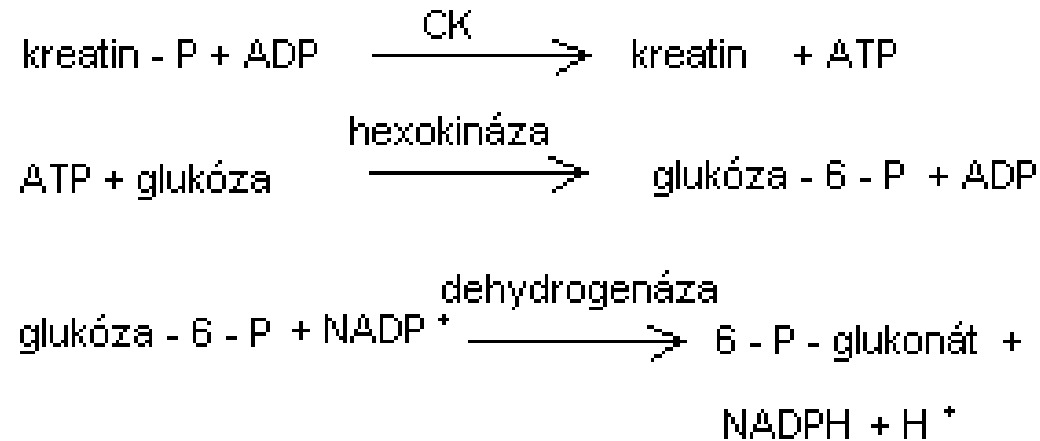
Alternativně: stanovení poměru celk. CK / AST (aspartátaminotransferáza),

konc . AST je (relativně) mnohem vyšší u srdečního svalu než kosterního, u AIM vzroste **AST cca 10x**,
coz je 2-násobně více než **CK (5x)** → poměr celk. CK / AST klesá (považováno ale za obsolentní pro
dg. AIM)

CK-MB překročí horní limit za cca 3-8 hodin po začátku AIM a vrací se do referenčních hodnot („do
normálu“) po 48-72 hodinách

Stanovení CK (plasma, ne serum)

- Stanovení celkové aktivity především enzymaticky:



- NADPH + H⁺ se detekuje fotometricky (340nm) nebo tetrazolivou barvičkou (fotometrie ve viditelné oblasti)

- Stanovení jednotlivých izoenzymů
 - A) elfo v agarózovém gelu (mají různé pI), detekce chromogenním substrátem
 - B) chromatograficky (DEAE = anion exchange chromatography) – rozdílné pI
 - C) Imunochemické metody:
 - 1) Imunoprecipitace – pomoci spec. Ab proti jednotce B odstraněn CK-1 a CK-2 ---> stanovení CK-3 anebo pomoci spec. Ab proti jednotce M odstraněn CK-2 a CK-3 ---> stanovení CK-1
celk CK = CK1 + CK2 + CK3
 - 2) Imunoinhibice – specifické Ab se váží v aktivním místě enzymu, čímž se eliminuje aktivita příslušné jednotky (M,B)

Referenční hodnoty celk. CK (enz. aktivita) v krvi závisí na věku, pohlaví, množství svalové hmoty, fyzické aktivitě

Muži - přibližně: 4ukat / L

Ženy - přibližně: 2ukat / L

Referenční hodnoty CK-MB (enz. aktivita): do 0.5 ukat/L

a při zvýšené celk. CK nesmí přesáhnout 6% celk. aktivity CK

celk CK / AST < 10 pak se jedná o AIM

celk CK / AST > 10 pak se jedná o poškození kosterního svalstva

Jiný diagnostický záměr než dg. AIM:

- prognostický význam pacientů s nestabilní AP - nadlimitní celk. CK a CK-MB souvisí s vyšší pravděpodobností AIM
- monitorování reperfuze (po trombolytické terapii)

Laktátdehydrogenáza (LD, LDH)

- zjištěna v řadě tkání: kosterní svalstvo, játra, srdce, ledviny, červené krvinky...
- 5 cytosolických izoenzymů (LD-1,...LD5), každý má 4 podjednotky, které mohou být dvojího typu (M= muscle, H= heart): LD-1 = H₄, LD-2 = H₃M₁, LD-3 = H₂M₂, LD-4 = H₁M₃, LD-5 = M₄

LD není tkáňově specifický enzym = není ani dg. specifický, diagnosticky se nejvíce využívá **celk. LD** a **LD-1** (LD-1 je přítomen nejen v srdci ale i kosterním svalstvu – výsledek je ovlivněn fyzickou aktivitou)

Celková akt. LD překročí horní limit za cca 12-18 hodin po začátku **AIM**, maximum dosáhne za 48-72 hod a vrací se do referenčních hodnot po 6-10 dnech (platí i pro LD-1). LD-1 je používán v diagnostice především u pacientů, kteří si stěžují na symptomy AIM trvajících více než 24 hod. a poměr LD-1 / LD-2 pro monitoring postoperačního stavu (poškození srdce nezjištěné před operací).

Stanovení LD (plasma, ne serum)

Enzymaticky (neutrální nebo alkal. prostředí):

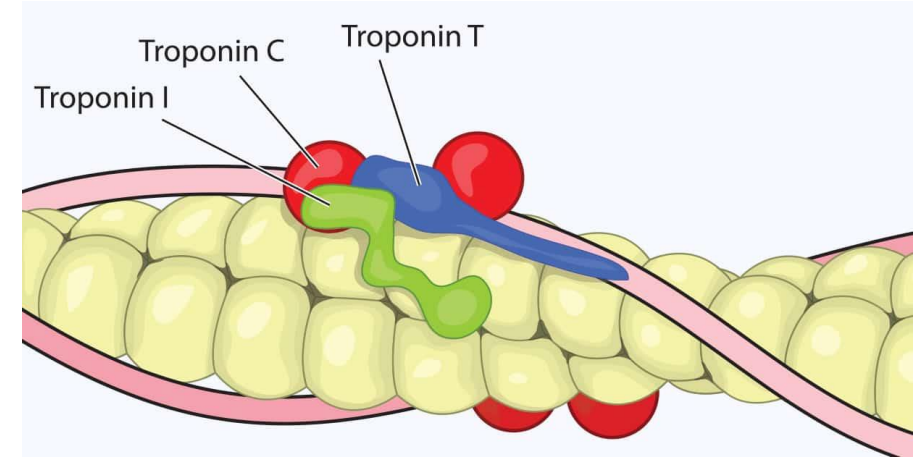


- Stanovení jednotlivých enzymů: elektroforeticky v agarózovém gelu
- Referenční hodnota: dospělí do 7.5 ukat / l

Troponin

Existují 3 různé proteiny: troponin C, troponin I a troponin T, řada izoform, fyziologie: součást myofibril (stah svalu), diagnosticky nejdůležitější:

cTnT a cTnI (c= cardiac specific) mají o 31 resp 11 AK více než izoformy m (m=skeletal muscle)




cTnT a cTnI překročí horní limit za cca 3-8 hodin po začátku AIM a vrací se do referenčních hodnot („do normálu“) po 4-10 dnech

Troponin v diagnostice pacientů AIM je **specifický** laboratorní ukazatel.

Troponin se používá v dg.:

- Rozlišení bolesti na hrudníku srdečního a nesrdečního původu (často když EKG, ECHO nejsou typické)
- Posouzení anginy pectoris – jsou-li troponiny nad limitem, pak je třeba zahájit preventivní antiagregační léčbu (nestabilní angina pectoris)
- Postoperativní monitoring (není možné použít stanovení CK-MB)

- Srovnání cTnT vs. cTnI: cTnT je „přirozeně“ zvýšen také u dialyzovaných pacientů (poškození ledvin)  cTnI je používán jako marker poškození myokardu u dialyzovaných pacientů

Referenční hodnoty: cTnI < 0.01 - 0.2ug / l (podle výrobce)
cTnT < 0.014ug / l

- cTnI je hlavních 8 dodavatelů v ČR – problémy se srovnatelností metod (refer. hodnotami), imunochemické metody
- cTnT do 2013 chráněno patentem - Roche - odpadá problém viz. výše s harmonizací výsledků, nový fenomén **hs/ultrasensitivní cTnT**

Prognosticky (ne diagnosticky) je ale významná jakákoli naměřená hodnota cTn (cTnT nebo cTnI); cTn souvisí s němými koronárními lézemi a jsou prognostickým indikátorem kardiovaskulárního rizika.

Rychlá diagnostika na bázi imunochemografie:

plná krev, dg. AIM

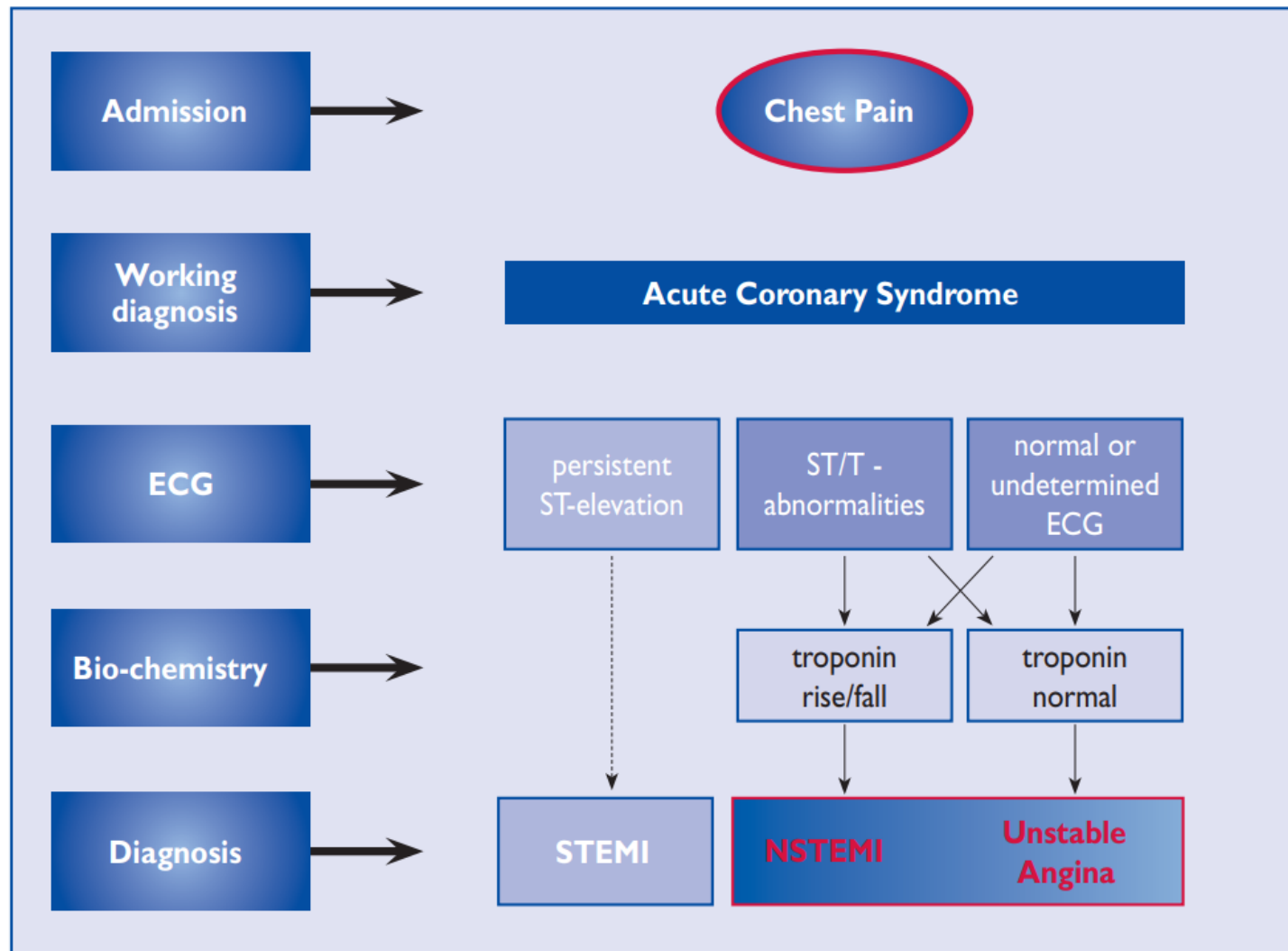


MUNI
PHARM

Rok 2017: změna v klasifikaci (dg.) – u pacientu, jejichž koncentrace troponinu nepřekročí horní limit 99. percentilu se zavádí nově „delta 1 hodina“ a „delta 3 hodiny“

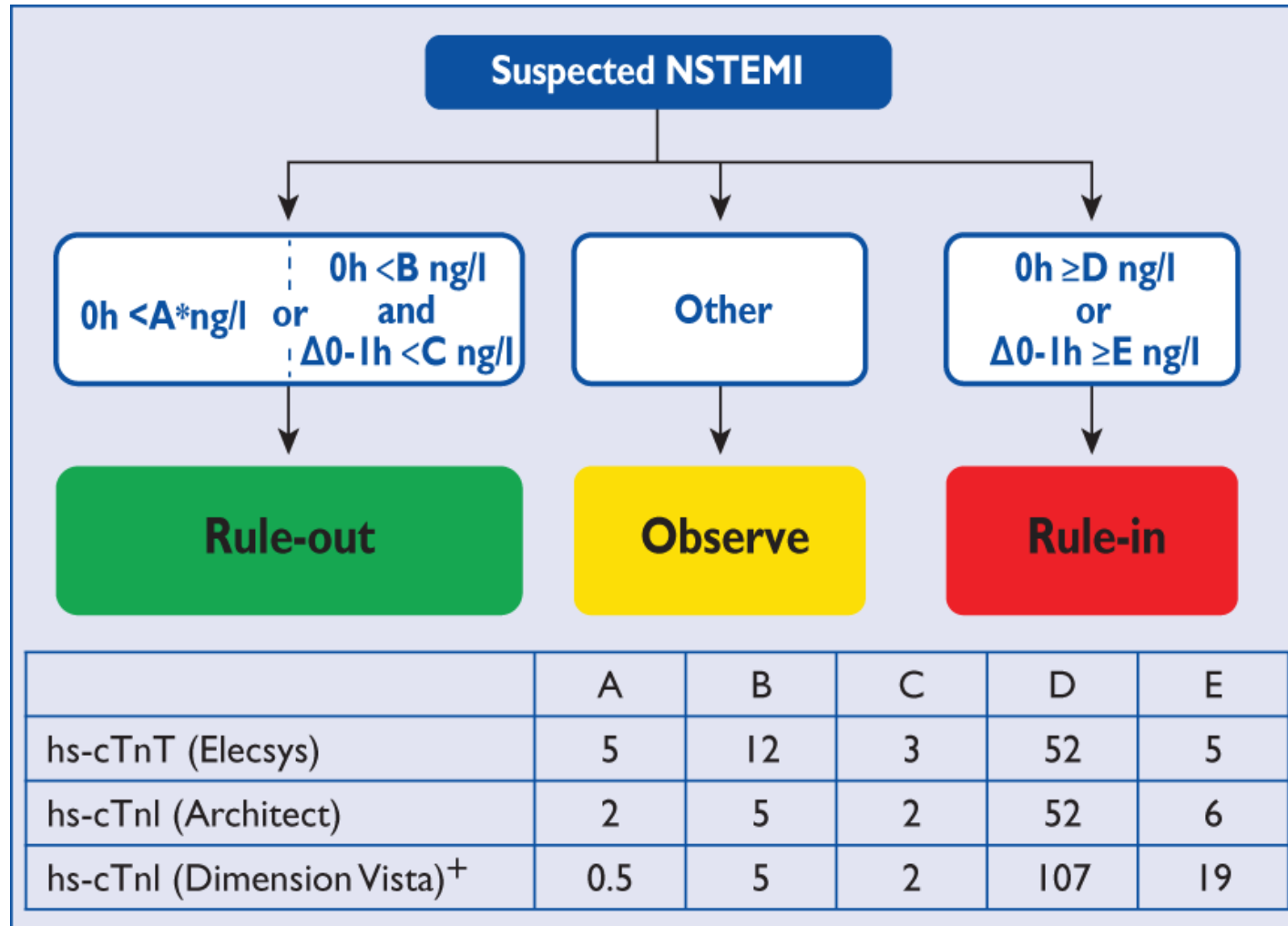
podmínka: nutno použít dg soupravu **hs/ultrasenzitivní** troponin

Dignostické schéma AIM:



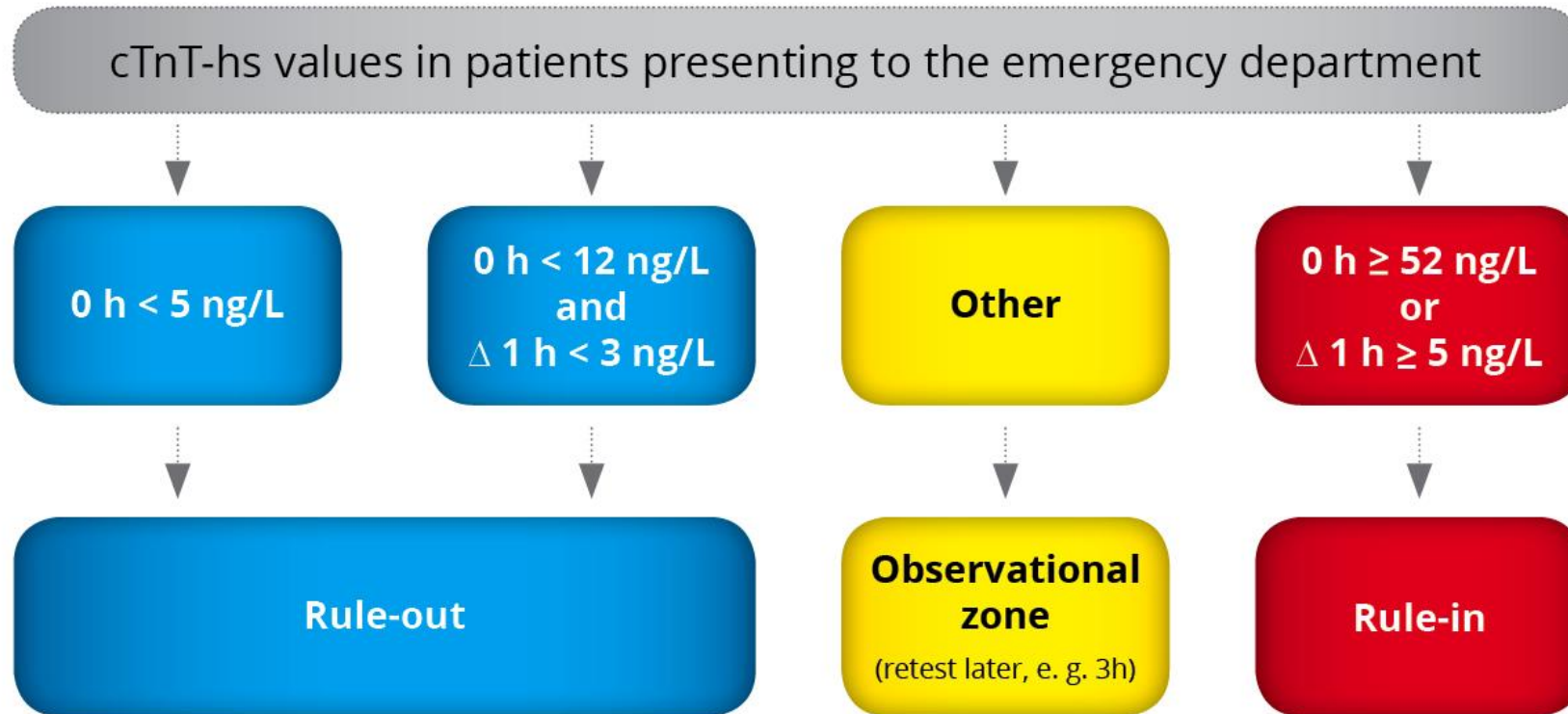
Ref: Acute Coronary Syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation (Management of) Guidelines (2015)
European Heart Journal, Volume 37, Issue 3, 14 January 2016, Pages 267–315

AMI: diagnosis



Ref: Acute Coronary Syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation (Management of Guidelines (2015)
European Heart Journal, Volume 37, Issue 3, 14 January 2016, Pages 267–315

cTnT-high sensitive



Ref: Acute Coronary Syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation (Management of) Guidelines (2015)
European Heart Journal, Volume 37, Issue 3, 14
January 2016, Pages 267–315

Troponin – porovnání výrobců, vliv věku a pohlaví

Výrobce / analyt	Horní limit 99. percentilu (ng/l)
Roche Elecsys/ cTnT	12-16
Abbott ARCHITECT / cTnI	14-26
Beckman Access / cTnI	9-32
Singulex / cTnI	10-40
Siemens Vista / cTnI	9-58

Věk (rozmezí)	35-44	45-54	55-64	65-74
99. percentil - muži (ng/l)	20	20	37	47
99,percentil - ženy (ng/l)	8	8	19	37

Myoglobin

fyziologie: váže kyslík v kosterním a srdečním svalstvu

V krvi (séru) se objevuje **velmi krátce** po poškození svalu (kosterního nebo srdečního) ----> není ale specifický, má nejrychlejší nástup

Stanovuje se také proto při monitorování reperfuze po trombolytické terapii u AIM.

Referenční hodnoty:

Muži pod 80ug / l Ženy pod 60ug / l

AIM: obvykle nad 500ug / l

Metody stanovení myoglobinu

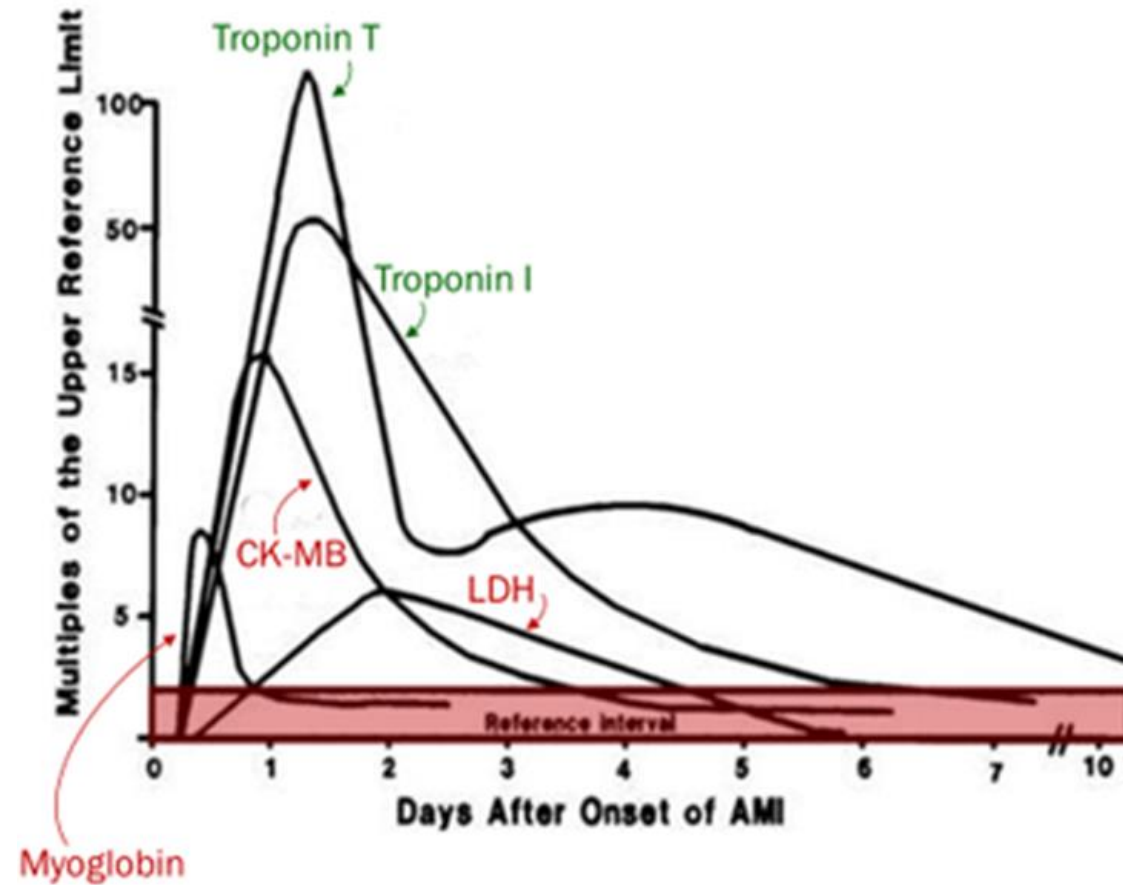
RIA, latexová aglutinační metoda (30min, pouze semikvantitativní), sandwich ELISA s použitím monoklonálních protilátek (2hod) ----> nově nefelometrie (15 min), turbidimetrie (2min) v režimu STATIM

Rychlá diagnostika: imunochromatografie

8 min, plná krev, dg. AIM



Shrnutí



V laboratořích převažuje následující schéma:

- 1) **cTnI nebo cTnT (+ delta 1hod nebo 3hod)**
- 2) **(cTnI nebo cTnT) + CK-MB**

Reinfarkt

Reinfarkt v datech:

Do 30D: 3-5%

Do 1R: 5-10%

Dlouhodobě: 20-30%

Problém:

přetrvávající zvýšení srdečních markerů

Diagnostika reinfarktu v laboratoři:

delta (hs/ultrasensitivní cTnT)

+ CK-MB

+ myoglobin

+ H-FABP (FABP3)

Další ukazatele CV poškození

- NP (natriuretické peptidy): ANP (především v síních myokardu), BNP (především v komorách myokardu), CNP (endotel, hypofýza) – fyziologie: natriuretické a vazodilatační účinky
patofyziologie: stimulem pro uvolnění do cirkulace je objemové a tlakové přetížení příslušných srdečních oddílů (marker srdečního selhávání)
= dg srdečního selhávání

v rutíně se využívá především NT-proBNP (delší biolog. poločas než vlastní BNP)

- Ischémií modifikovaný albumin
- Endothelin (ET-1) (marker endoteliální dysfunkce)
- Cytokiny (TNF alfa, IL-6, IL-1)
- Metaloproteinázy

NT-proBNP

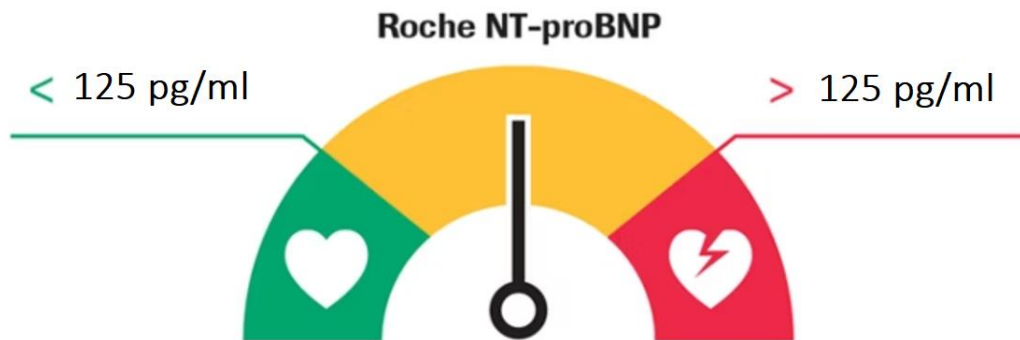
- Diferenciální diagnostika dušnosti: rozlišení srdečního původu (srdeční selhání) od nesrdečního (CHOPN, ARDS....)
- Odhad rizika krvácivých stavů u pacientů s fibrilací



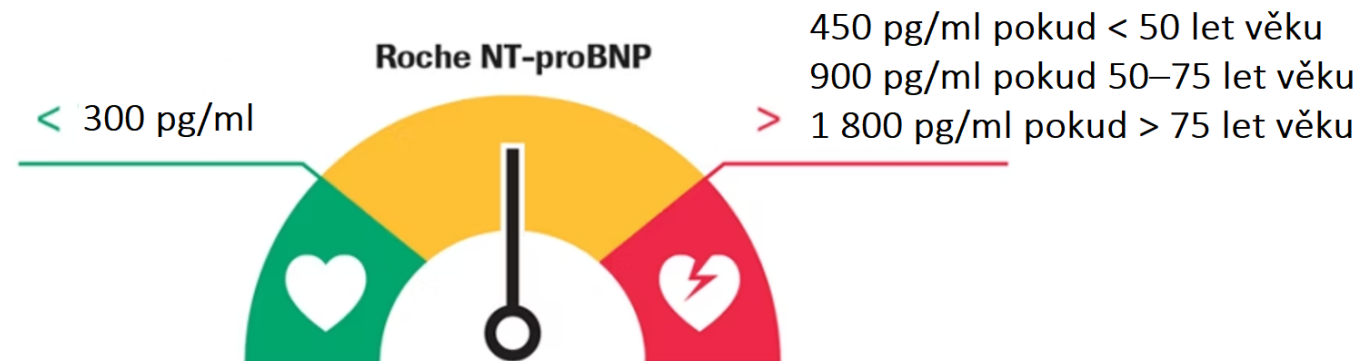
NT-proBNP

- Diferenciální diagnostika dušnosti: rozlišení srdečního původu (srdeční selhání) od nesrdečního (CHOPN....)

akutní srdeční selhání



chronické srdeční selhání



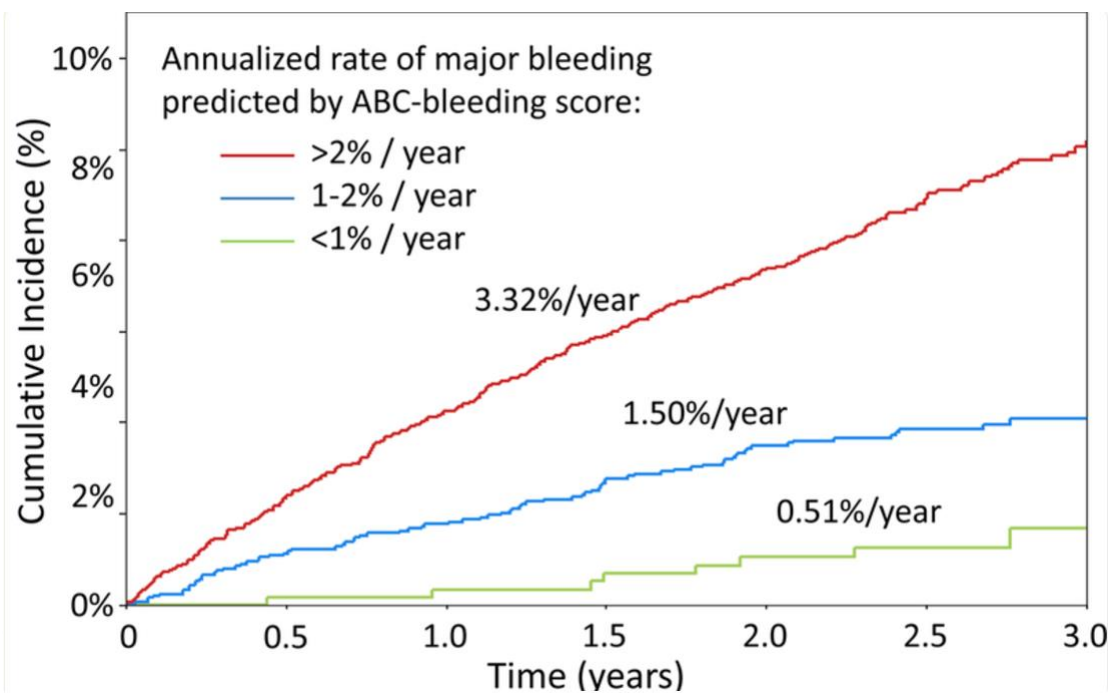
ABC rizikové skóre

odhad rizika krvácivých stavů anebo trombózy u pacientů na antikoagulační léčbě (pacienti s AF)

Ref: Berg DD et al. Performance of the ABC Scores for Assessing the Risk of Stroke or Systemic Embolism and Bleeding in Patients With Atrial Fibrillation in ENGAGE AF-TIMI 48. Circulation. 2019 Feb 5;139(6):760-771

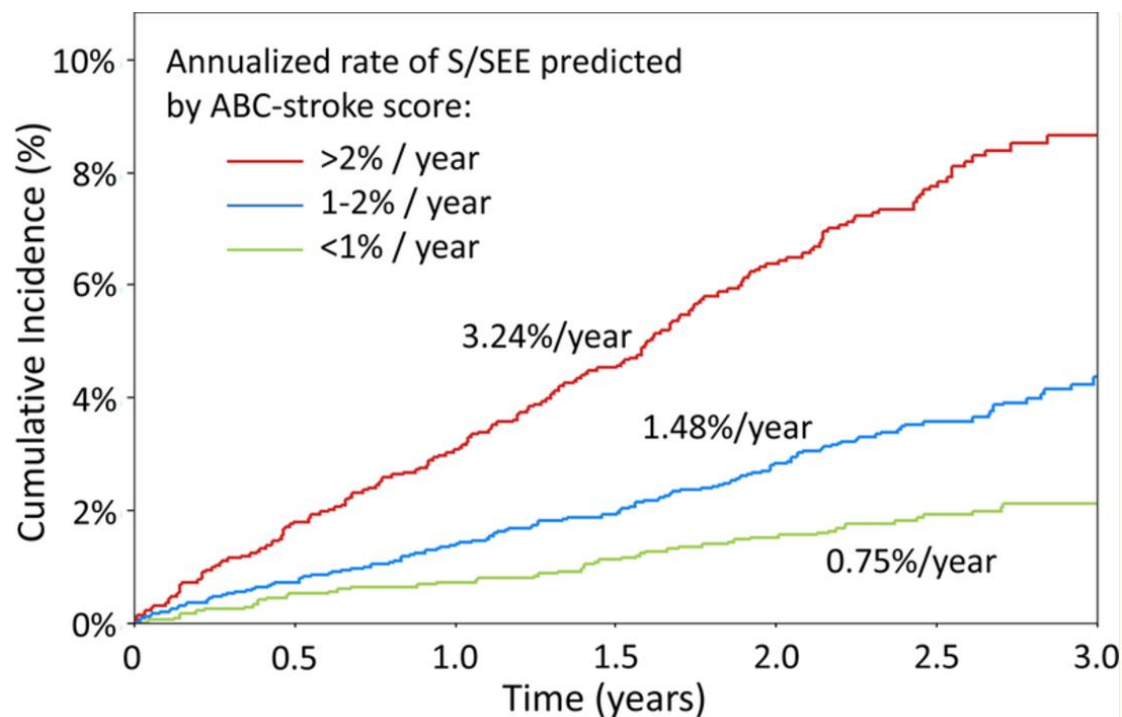
KRVÁCIVÉ STAVY

hsTnT a GDF-15



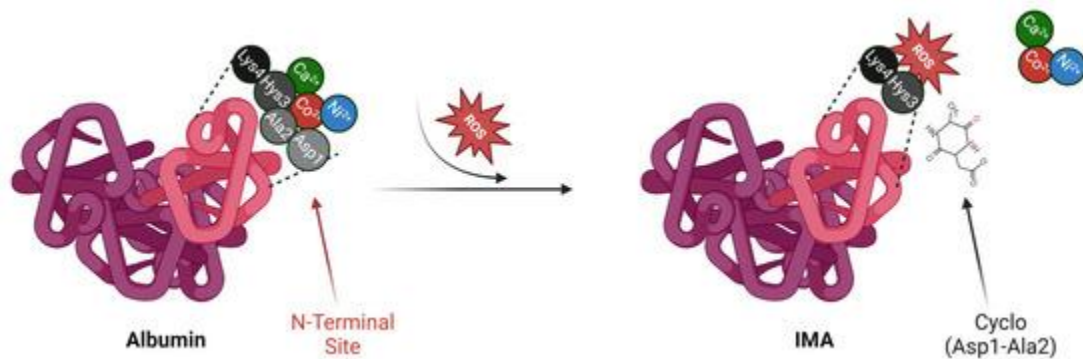
TROMBÓZA

hsTnT, NT-proBNP a GDF-15



Ischémií modifikovaný albumin

- stanovení ischemií modifikovaného albuminu (IMA) pomocí testu zjišťujícího vazebnou kapacitu albuminu pro kobalt (ACB) v diagnostice akutní ischemie myokardu ➡ UV/VIS stanovení
- senzitivita ACS 82 % (pro srovnání senzitivita EKG cca 45 % a troponinu T cca 20 %). Při kombinaci IMA +a troponin T + EKG senzitivita cca 95% ➡ užitečné pro pacienty s podezřením na ACS bez změn EKG a negativními troponiny



Ref: Zoroddu, S.; Zinellu, A.; Carru, C.; Sotgia, S. Analytical Insights into Methods for Measuring ischemia-Modified Albumin. *Molecules* 2024, 29, 4636

Kazuistika: takotsubo kardiomyopatie

syndrom zlomeného srdce

frekvence: cca 1–2 % všech případů pacientů přijatých s podezřením na akutní koronární syndrom

mortalita: 1- 5%

Žena 55 let, dušnost, bolest na hrudi, mírná elevace ST segmentu na EKG, CB-MB: 8%, cTnT: 1.5 ng/ml, dovyšetření NT-proBNP 1140 pg/ml



vysoké cTnT při přijetí, nízká dynamika cTnT, EKG: Q vlny chybí, T vlny výrazné

**MUNI
PHARM**