

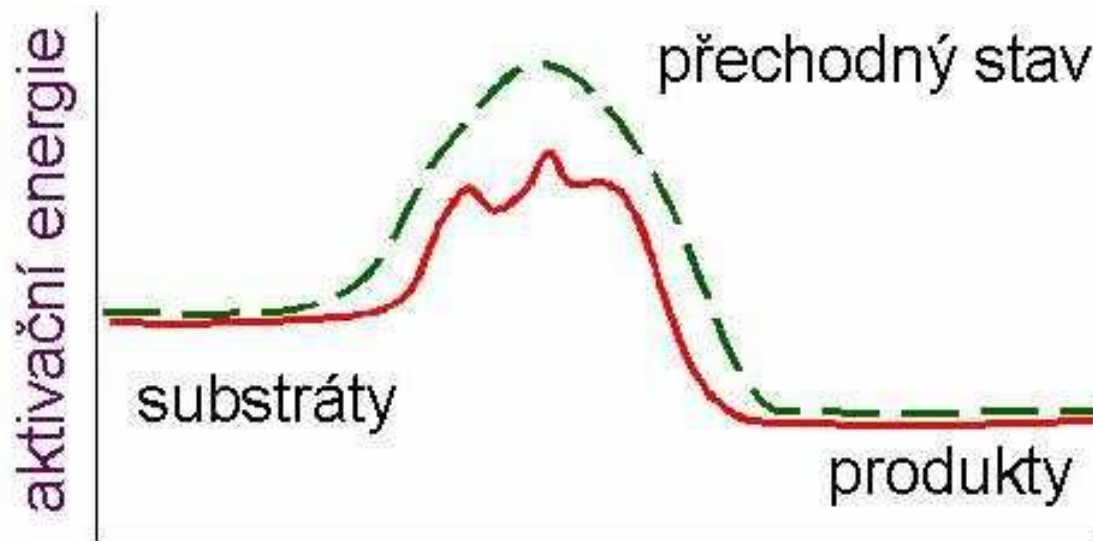
Enzymové a jiné markery
využívané v diagnostice
vybraných patologických stavů

Cíl praktika

- opakování základních znalostí o enzymech
- teoretické seznámení s hodnocením aktivit enzymů v biologickém materiálu
- stanovení izoenzymů LDH

Enzymy

- biokatalyzátory
- snižují aktivační energii
- neovlivňují rovnovážný stav reakce



Enzym

- bílkovina
- holoenzym = apoenzym + kofaktor
- kofaktor
 - prosthetická skupina
 - koenzym
- aktivní místo

Klasifikace enzymů

1. oxidoreduktázy
2. transferázy
3. hydrolázy
4. lyázy
5. izomerázy
6. ligázy

Lokalizace enzymů

- extracelulární
- intracelulární
 - membránově vázané
 - cytosolické
 - organelové

Vlastnosti enzymů

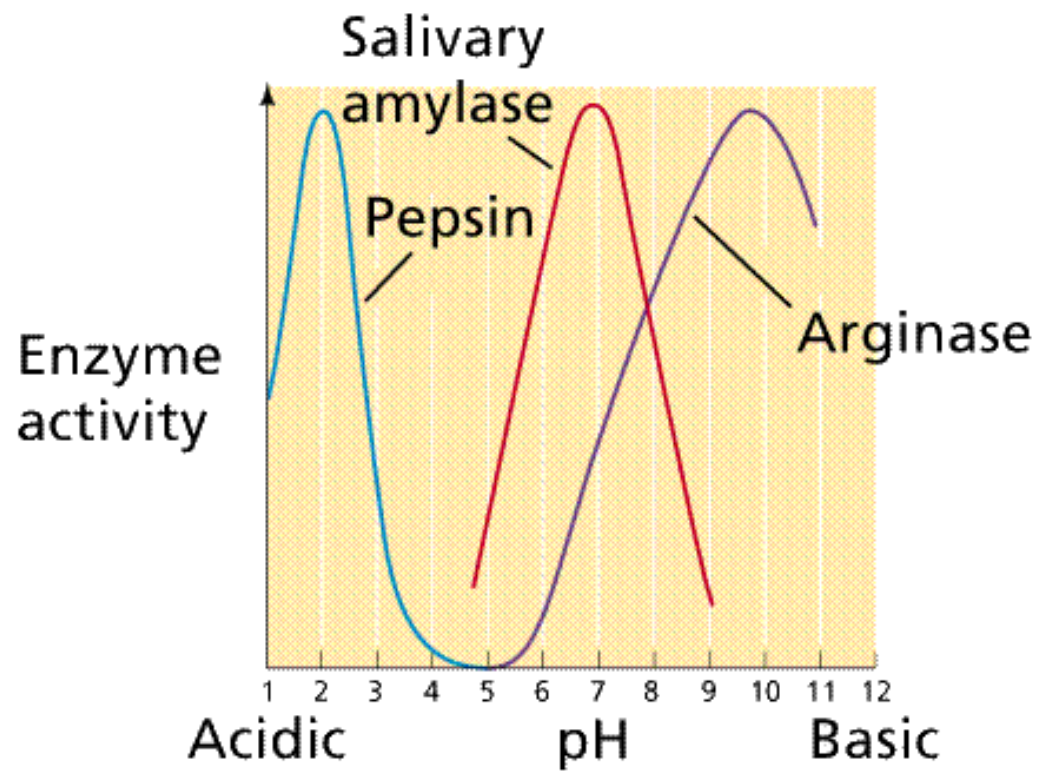
- účinnost
 - specifita – reakční a substrátová
 - pracují za mírných podmínek
 - snadno regulovatelné
-
- složitá struktura
 - rychlé opotřebování

Vyjadřování aktivity enzymů

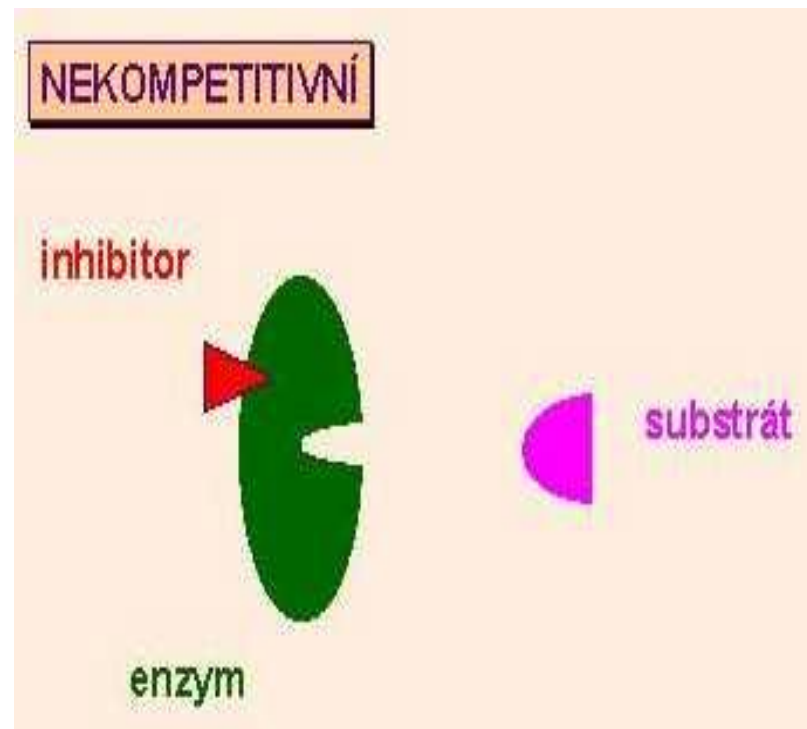
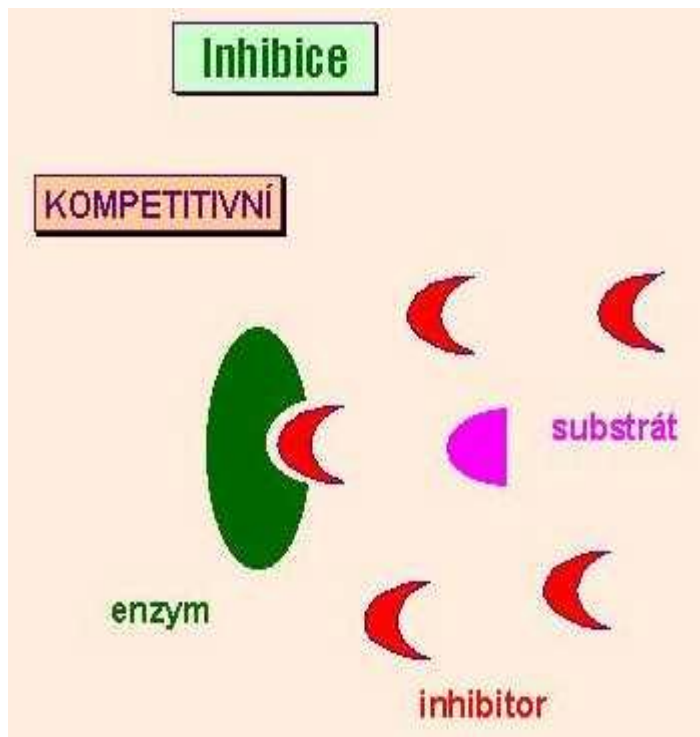
- katal – množství přeměněného substrátu za časovou jednotku ($\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$)
- specifická aktivita – aktivita vztažená na hmotnost
- číslo přeměny

Ovlivnění aktivity enzymů

- koncentrace substrátu
- pH
- teplota
- přítomnost aktivátorů a inhibitorů



Inhibice



Vyšetřované vzorky

- aktivitu enzymů stanovujeme nejčastěji v séru a moči
- enzymy v tkáňových řezech detekujeme imunohistochemicky

Plazmatické enzymy

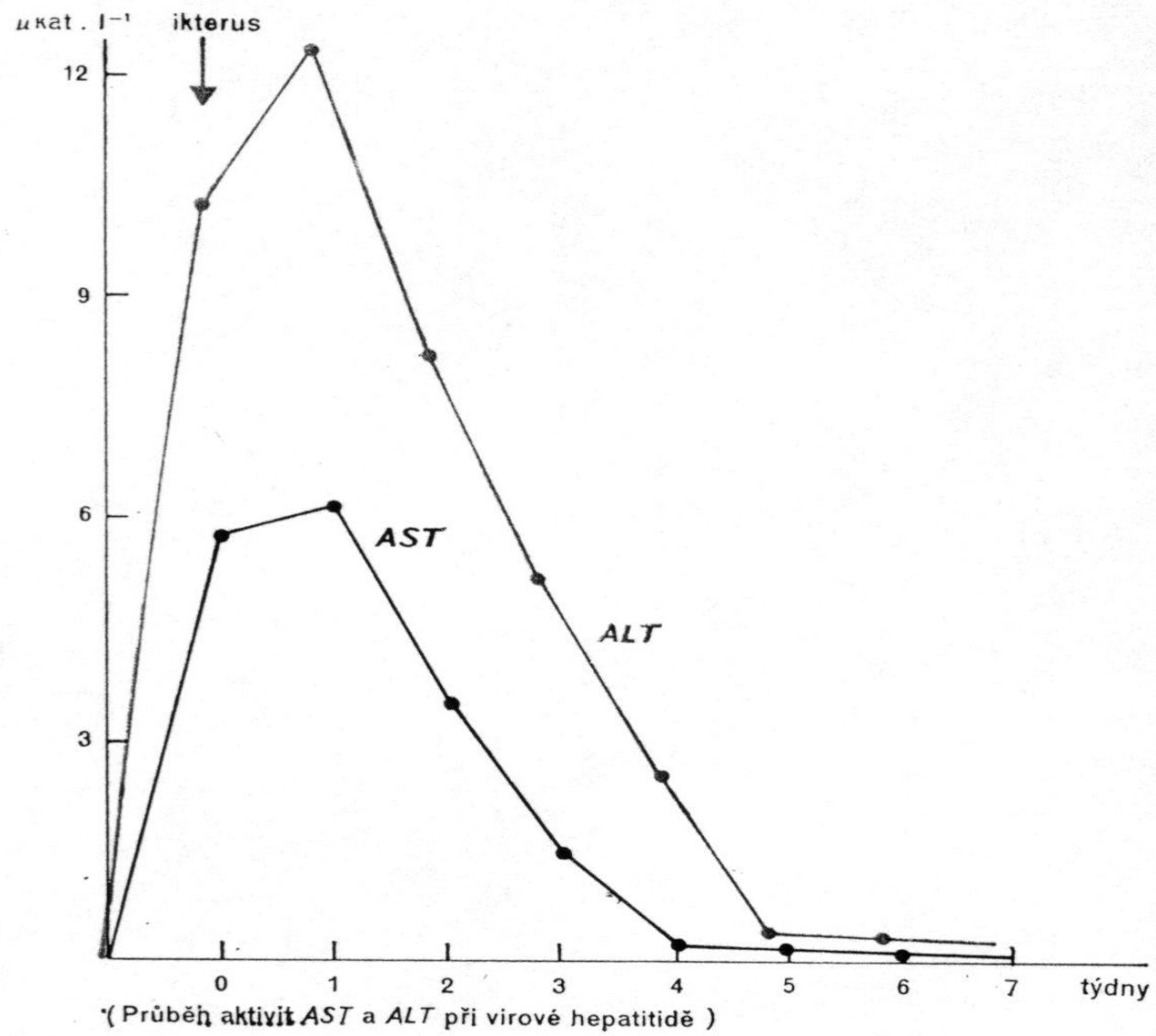
- **specifické** – enzymy srážení krve, ceruloplazmin, lipoproteinová lipáza
- **nespecifické**
 - a) enzymy exokrinních žláz
amyláza, kyselá fosfatáza
 - b) intracelulární enzymy
enzymy hlavních metabolických drah

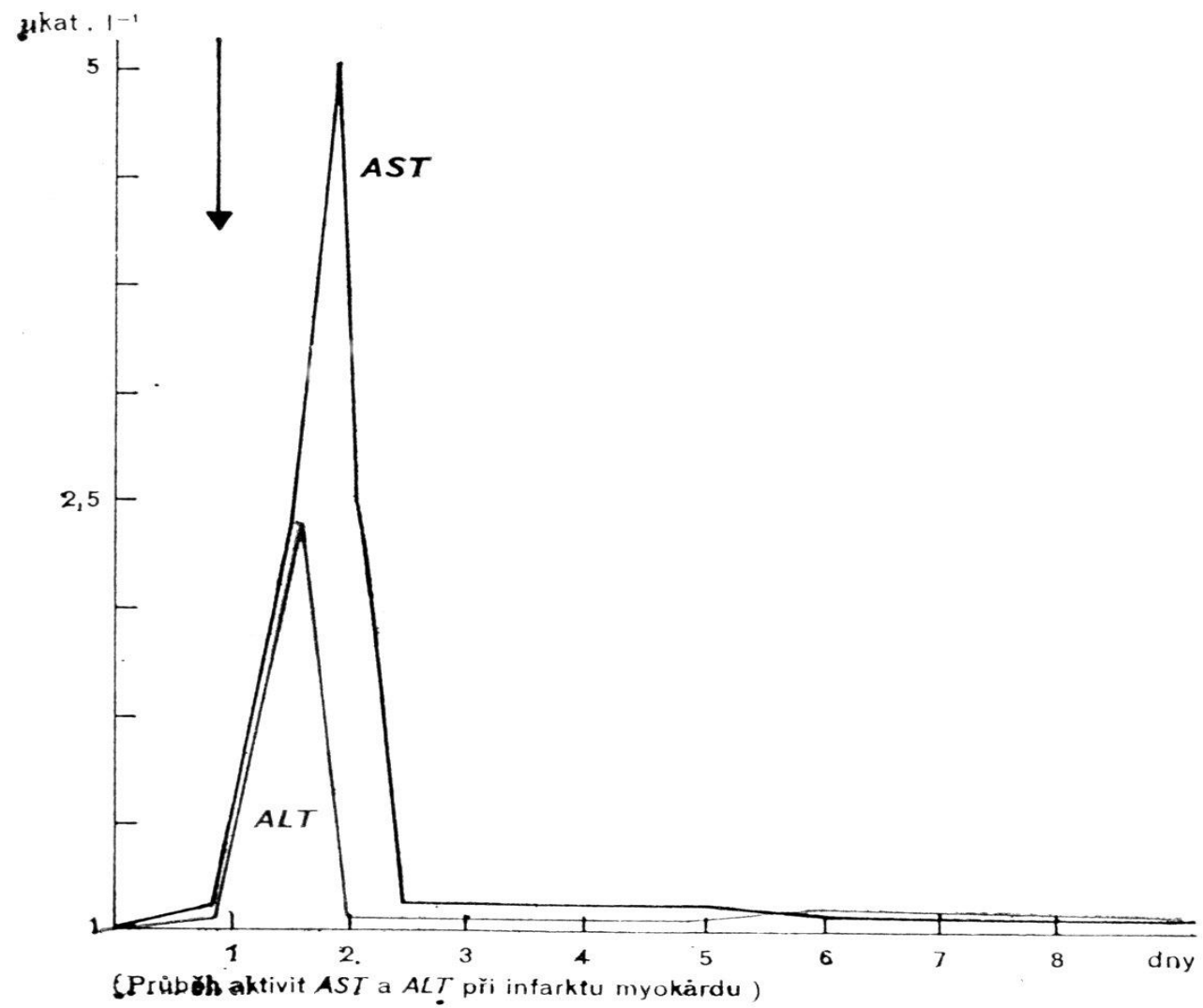
Jiné dělení plazmatických enzymů

1. **sekreční** - specifické plazmatické enzymy
2. **indikátorové** – v jaterní b. plní své funkce, mohou vystupovat do plazmy
3. **exkreční** – eliminovány žlučí

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





Formy výskytu enzymů

- proenzymy (zymogeny)
- izoenzymy
 - primární
 - sekundární

Detekce izoenzymů

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

Enzymový „vzorec“ orgánu

- závisí na
 - a) specifické aktivitě enzymu
 - b) zastoupení izoenzymů
- změna v průběhu ontogeneze
- uvolnění enzymů – indikátor poškození

JATERNÍ MARKERY

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

Odhalení poškození hepatocytů

Alaninaminotransferáza (ALT)

L-alanin + 2-oxoglutarát \longleftrightarrow pyruvát + L-glutamát

- reakce je reverzibilní, uplatňuje se při syntéze, odbourávání i přeměně aminokyselin
- cytoplazmatický enzym
- nejvíce je obsažen v hepatocytech, hladina zvýšena již při poruše membránové permeability

Aspartátaminotransferáza (AST)

- L-aspartát + 2-oxoglutarát \longleftrightarrow oxalacetát + L-glutamát
- reakce je reverzibilní, uplatňuje se při syntéze, odbourávání i přeměně aminokyselin
- cytoplazmatický a mitochondriální izoenzym
- obsažen v játrech, myokardu, kosterním svalu, ledvinách a pankreatu
- cytoplazmatický izoenzym se do krve dostává již při narušení permeability buněčné membrány, uvolnění mitochondriálního izoenzymu provází hepatocelulární nekrózu

- 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 je ALT vyšší než AST
- výjimky - $AST/ALT > 2$
 - alkoholické poškození
 - postnekrotické cirhózy

LDH

- tetramer, podjednotky H a M
- LDH₁ HHHH myokard, ledviny
- LDH₂ HHHM
- LDH₃ HHMM
- LDH₄ HMMM
- LDH₅ MMMM svaly, játra

Laktátdehydrogenáza

- laktát + NAD⁺ \longleftrightarrow pyruvát + NADH
- 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

Normální hodnoty izoenzymů LDH

	rozmezí v %
LDH 1	31 - 49
LDH 2	38 - 58
LDH 3	5,5 – 16,5
LDH 4	0,0 – 0,7
LDH 5	0,0 – 1,5

Obstrukce žlučových cest

Alkalická fosfatáza (ALP)

- membránový enzym katalyzující hydrolýzu fosfátových esterů při alkalickém pH
- tetramer, do cirkulace je z membrán uvolňovaný jako dimer
- široce rozšířená - vyskytuje se především v játrech, střevě a kostech (různé izoenzymy)
- stanovení aktivity v séru se využívá hlavně k 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 u mnoha dalších stavů (tumory jater, cirhóza)

GMT (γ -glutamyltransferáza)

- membránově vázaný enzym nacházející se v játrech, ledvinách, pankreatu a ve střevě
- 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
- stanovení aktivity GMT v séru se využívá pro posouzení hepatobiliárních onemocnění

Syntetická 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 (CHE)

- 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

Hemokoagulační faktory

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

S-lecitin-cholesterolacyltransferáza (LCAT)

- syntetizována v hepatocytech, odkud se dostává do krve, ve které tvoří komplex s HDL a katalyzuje přenos mastné kyseliny z lecitinu na neesterifikovaný cholesterol uvolněný z buněčných membrán
- pokles plazmatické koncentrace u parenchymových jaterních lézí

NÁDOROVÉ MARKERY

Nádorové markery

- Zhoubné novotvary patří k nejčastějším příčinám úmrtí
- Růst incidence jakých tumorů?
- Dochází k posunu do mladších věkových kategorií
- Cílem je co nejčasnější diagnostika
- Zobrazovací metody vs. imunochemické metody
- Metodické zdokonalování

Co to jsou nádorové markery ?

- Molekuly proteinového charakteru
 - Celulární tumorové markery
 - Humorální nádorové markery
- Produkce nádorových markerů
 - Přímou nádorové buňky (s nádorem asociované antigeny)
 - Jiné tkáně jako odpověď na maligní proces (indukované nádorové markery)

Vlastnosti „ideálního“ nádorového markeru

- Vysoká specifická vzhledem k malignímu onemocnění
 - Pacienti bez zhoubného nádoru by měli poskytovat negativní výsledek testu
 - Zdaleka to neplatí
 - Falešně pozitivní výsledky u řady nenádorových onemocnění (záněty)

Vlastnosti „ideálního“ nádorového markeru

- Vysoká orgánová specifická
– Pozitivní hodnota by měla cíleně vypovídat o postižení konkrétního orgánu

Tumorový marker	Onemocnění či jiná příčina
CEA	Záněty jater, cirhóza, pankreatitida, kouření
AFP	Jaterní cirhóza, hepatitida
CA 15-3	Jaterní cirhóza, hepatitida, snížení GFR
PSA	Benigní hyperplazie prostaty, vyšetření per rectum, katetrizace močového měchýře
hCG	Mola hydatidosa, těhotenství
Feritin	Záněty, poruchy metabolismu železa

Vlastnosti „ideálního“ nádorového markeru

- Vysoká citlivost
 - Schopnost laboratorního ukazatele prokázat přítomnost zhoubného nádoru v počátečním stádiu
 - Mnoho tum. markerů tuto podmínku nesplňuje – zvýšení až u velkých generalizovaných tumorů
 - Citlivost můžeme zvýšit kombinací několika tumorových markerů

Vlastnosti „ideálního“ nádorového markeru

- Korelace mezi výší lab parametru a velikostí nádoru
 - Koncentrace závisí nejen na rozsahu nádoru, ale i na stupni zralosti jeho buněk, ale také na schopnosti produkovat určitý marker a vyplavovat ho do krve

Oblasti užití tumorových markerů

- Screening zhoubných nádorů
- Diagnostika zhoubného novotvaru
- Určení stádia nádoru a jeho prognózy
- Sledování průběhu choroby a efektu terapie

Konkrétní příklady nádorových markerů

- Onkofetální a onkoplacentární antigeny
 - Alfa1 fetoprotein (AFP)
 - Produkuje buňky žloutkové vaku a jater plodu
 - U dospělých je koncentrace minimální
 - Koncentrace se zvyšuje u primárního karcinomu jater
 - CA 15-3
 - Používá se pro stanovení posouzení úspěšnosti léčby a včasné předpovědi recidivy u karcinomu prsu
 - hCG
 - Diagnostika gravidity
 - Vysoké hodnoty při mola hydatidosa – přechod v choriokarcinom
 - U mužů v případě germinativních nádorů
 - Jaká je funkce hCG v těhotenství??

- Enzymy
 - PSA
 - Produkován buňkami prostaty
 - Není úplně zřejmá fce
 - PACP (prostatická kyselá fosfatáza)
 - Podobné indikace k vyšetření jako u PSA
 - ALP
 - Je zvýšený u osteosarkomu
 - LDH
 - Katepsin D
 - Intracelulární proteáza
 - Degraduje bazální membránu – umožňuje invazivní růst a metastázování nádoru
 - Ca prsu
- Nové nádorové markery
 - MT
 - MMP
 - ??

SRDEČNÍ MARKERY

Kreatinkináza (CK)

- cytoplazmatický a mitochondriální enzym
- katalyzuje reverzibilní přenos z fosfátu z ATP na kreatin
- $ATP + \text{kreatin} \longleftrightarrow ADP + \text{kreatinfosfát}$
- dimerický – podjednotky M (muscle) a B (brain)
- 3 izoformy – CK-MM, CK-MB, CK-BB
- izoenzym BB je typický pro hladký sval, mozek, prostatu
- izoenzym MM je typický pro příčně pruhovaný sval (kosterní sval a myokard)
- MB izoenzym je typický pro myokard, vyskytuje se také v kosterním svalstvu

- aktivita sérové kreatinkinázy vzrůstá zejména při poškození kosterního nebo srdečního svalu
- CK-MB - diagnóza akutního infarktu myokardu a monitorování reperfuze během trombolytické léčby akutního infarktu myokardu
- pro diagnostiku postižení jiných orgánů (prostata, mozek a další) se stanovení CK ani CK BB běžně nevyužívá.
- s nástupem stanovení myoglobinu a troponinu se význam stanovení výrazně snížil

Mitochondriální CK

- mitochondrie obsahují 2 typy CK - ubikvitní a sarkomerická
- přítomnost CK-MT znamená závažné postižení organismu (např. metastatickým nádorovým procesem) se špatnou prognózou

Myoglobin

- intracelulární protein srdečních i kosterních svalových buněk účastnící se aerobního metabolismu
- při poškození buněk se vzhledem k malé velikosti vyplavuje velmi rychle do krevního oběhu (za 0.5 až 2 h)
- nejmenší ze srdečních markerů – rychle se šíří, velmi rychle se odbourává
- vzhledem k výskytu myoglobinu i v buňkách kosterních svalů je markerem nespecifickým

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.
- srdeční izoforma troponinu I (TnI) se strukturně liší od analogické izoformy v kosterním svalu - umožňuje specifické stanovení

- **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

Natriuretické peptidy (NP)

- hlavní mechanismus fyziologicky antagonistující aktivaci systému RAAS
- syntetizovány ve formě neaktivních prohormonů, které jsou štěpeny na biologicky aktivní hormony a terminální fragmenty (NT), které jsou inaktivní
- při tlakovém nebo volumovém zatížení nebo ischemickém poškození srdce dochází ke zvýšenému uvolňování těchto peptidů a jejich prekursorů (prohormonů) z myokardu, jejich plazmatická koncentrace může být markerem myokardiálního poškození nebo zátěže
- mezi hladinami aktivních peptidů a jejich NT-fragmenty je těsná korelace

Natriuretické peptidy

- **mozkový natriuretický peptid (BNP)**
 - tvořen hlavně myokardem komor
- **atriální natriuretický peptid (ANP)**
 - převažuje syntéza v myokardu síní
- **N - terminální natriuretický propeptid typu B (NT-proBNP)**
- **natriuretický peptid C (CNP)**
 - produkován buňkami endotelu cév a CNS
- dnes běžně používané k diagnostice srdečního selhání, výhodou je vysoká negativní prediktivní hodnota

NP jako srdeční markery

- pro diagnostiku v klinické praxi je nejvýhodnější určovat NT-proBNP
- stanovení ANP je nevýhodné – rychlé vyplavování a velmi krátký biologický poločas
- srovnání BNP a NT-proBNP - BNP má kratší biologický poločas, horší stabilitu v oběhu
- stavy spojené se zvýšenou plazmatickou koncentrací NP
- srdeční dysfunkce a srdeční selhání, hypertrofie levé komory, plicní hypertenze, jaterní cirhóza s ascitem
- zvýšená plazmatická koncentrace - nízkou diagnostickou specificitu
- nález nezvýšené plazmatické koncentrace NP má vysokou negativní prediktivní hodnotu (90-95 %) a spolehlivě vylučuje poruchu funkce myokardu

Další srdeční markery

- AST
- LDH
- **fatty acid binding protein (FABP)**
 - cytoplazmatická bílkovina vázající mastné kyseliny
 - vysoká koncentrace v kardiomyocytech
 - kinetika podobná myoglobinu
- **hsCRP (C-reaktivní protein)**
 - protein akutní fáze
 - časný vzestup (6-10 hod), vysoký vrchol (až 100x) a krátký poločas v cirkulaci (19 hod)
 - u AIM podobné, ne tak vysoká elevační vlna

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

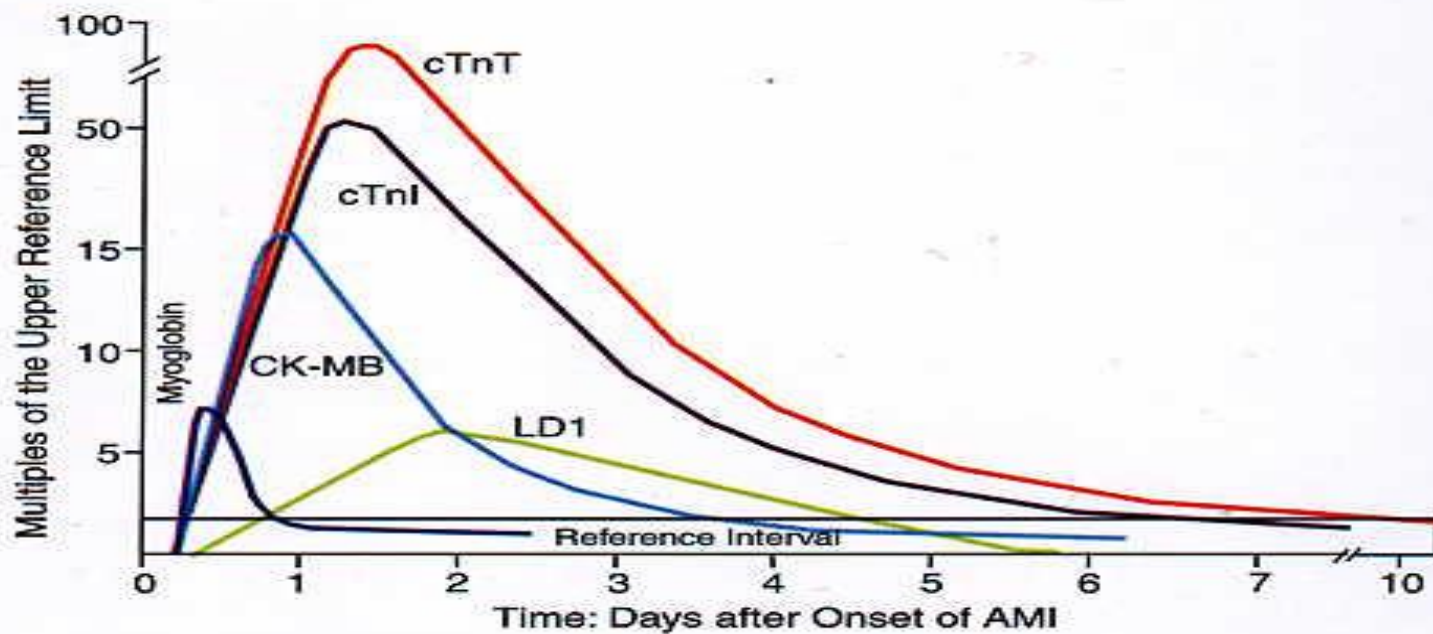


Figure 1. Release of cardiac biomarkers into blood following AMI. Time zero is defined as the moment of onset of symptoms. Marker concentrations are expressed in a common scale—as multiples of the upper reference limit for that marker.¹¹

cTnT = cardiac troponin T

cTnI = cardiac troponin I

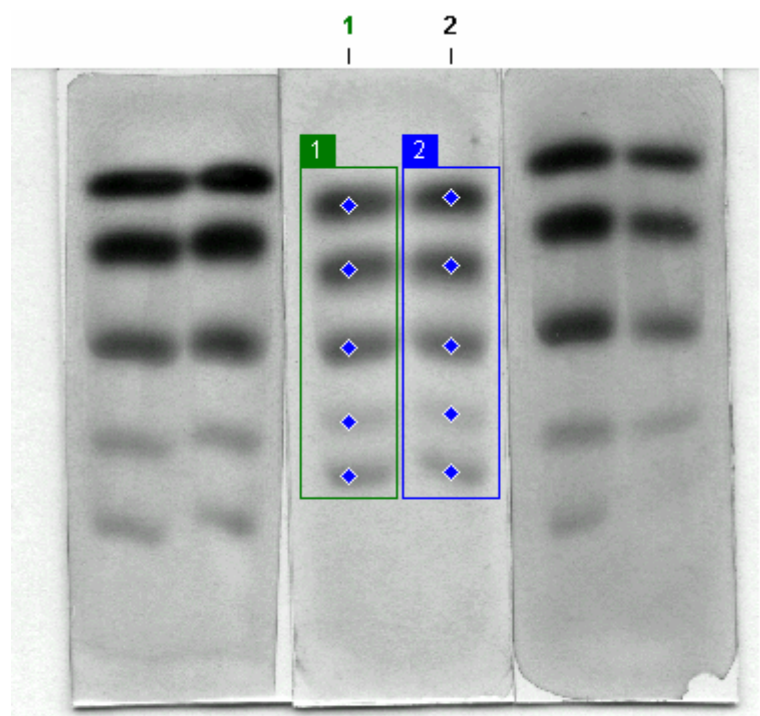
Elektroforetické dělení LDH

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

Detekce LD



Detekce elektroforetických drah



Denzitometrické hodnocení

