

BIOMARKERY

Na patologické procesy v organismu lze mnohdy usuzovat z přítomnosti látek obecně zvaných *markery*. Česky bychom asi řekli *ukazatelé*.

Ne vždy však mají biomarkery pouze tento význam – mohou sloužit i ke sledování průběhu choroby, k identifikaci jejího pozastavení (*remisi*) či vymizení, ale i jejího návratu. Nejčastěji se lze setkat s ukazateli/markery *maligních procesů* (tumorové markery či onkomarkery), ukazateli *infarktu myokardu* a *srdečního selhání* a ukazateli *patologie kostního metabolismu* (což nevylučuje existenci dalších markerů).



Asi nejobvyklejší představa markeru – značkovače, zvýrazňovače

Marker [angl.] = ukaz(ov)atel, oznamovatel, popisovač, návěstidlo, značka, značkovadlo

1. Nádorové markery

Nádorové markery jsou molekuly převážně proteinového charakteru, které jsou přítomny v organismu v důsledku vzniku a vývoje maligního procesu.

Nazývají se též *tumorové markery* (TM), případně *onkomarkery*.

Dají se definovat i jako laboratorně prokazatelné známky v biologických tekutinách, tkáních nebo buňkách, pomocí kterých je možno prokázat:

- riziko vzniku
- přítomnost
- prognózu
- účinnost (škodlivost) terapie
- vznik metastáz nebo reziduální choroby nádorového onemocnění.

Hlavní rolí nádorových markerů (v medicíně, i laboratorní) je

- sledování průběhu choroby
- sledování účinnosti terapie.

Tumorové markery jsou produkovány buď

- **samotným nádorem** (pak se nazývají *antigeny sdružené/asociované s nádorem*) nebo
- **jinými tkáněmi** jako odpověď na maligní proces v organismu (pak jde o *indukované nádorové markery*, např. *proteiny akutní fáze*).

Lze rozlišit tumorové markery

- **celulární** (vyskytují se v tkáni zhoubného nádoru)
- **humorální** (vyskytují se v tělních tekutinách).

Koncentrace tumorových markerů v séru má obvykle přímý vztah k typu a rozsahu onemocnění.

Doposud nebyl objeven žádný univerzální tumorový marker, ani specifita či senzitivita metod nedosahuje 100%. Znamená to tedy, že nezvýšená koncentrace nádorového markeru není ještě důkazem nepřítomnosti maligního onemocnění, a naopak pozitivní výsledek nemusí nutně znamenat zhoubný nádor.

Rozlišovací schopnost nádorových markerů umožňuje v příznivých případech odhalit nádor o hmotnosti *1 mg, tedy asi 10^6 maligních buněk*, zatímco klinická diagnóza bývá určena většinou až u nádoru, který obsahuje asi *10^9 buněk*.

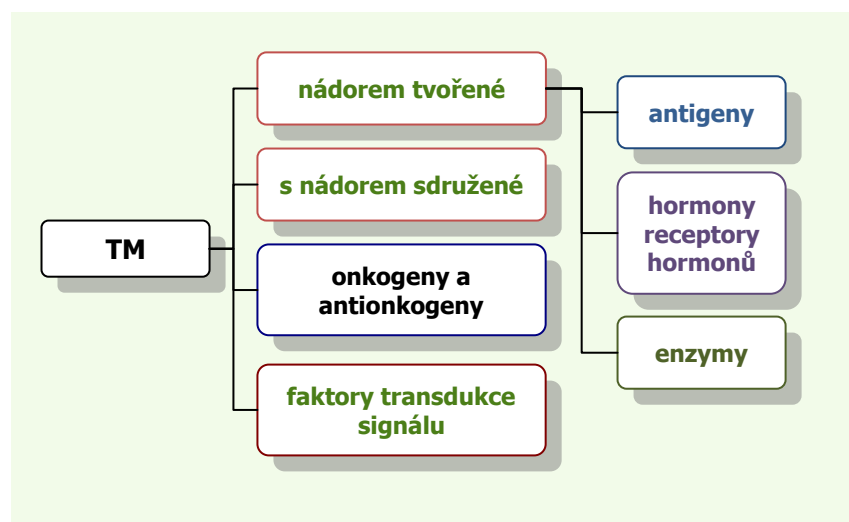
Jiný náhled na klasifikaci tumorových markerů

Nádorem tvořené	Antigeny	Onkofetální (AFP, CEA...)
		Onkoplacentární (hCG, izoenzymy ALP)
		„Carcinoma antigens“ (CA 19-9, CA 15-3...)
	Hormony Receptory hormonů	Paraproteiny
		Kalcitonin, katecholaminy...
	Enzymy	NSE...
S nádorem sdružené/asociované		CRP, okultní krvácení
Onkogeny a antionkogeny		BRCA1, p53...
Faktory transdukce signálu (Signální transdukce - proces „přeměny“ extracelulárního signálu na buněčnou odpověď transdukcí obecně se rozumí přeměna z jedné formy signálu na formu jinou, např. hlas v telefonu se mění na elektrické pulzy)		HER2/neu...

Prof. MUDr. Jaroslav Masopust, DrSc., ÚKBP, 2. lékařská fakulta UK v Praze, Labor Aktuell, 02/04, str. 4-8, Nádorové markery včera, dnes a zítra (1. část)

Totéž graficky

Masopust, J.



Signální transdukce jako obecný mechanismus přenosu informace mezi buňkami jednotlivých soustav hraje klíčovou roli v patogenezi onemocnění. Jako příklady lze uvést *zánětlivou odpověď organismu* nebo *poruchy lipidového metabolismu*. Narušení signální transdukce a regulace kaskád je jednou z příčin *maligního bujení*. Poruchy receptorů na genové úrovni vedou k závažným *metabolickým a endokrinním onemocněním*, ale také vedou ke *změnám kontraktility srdečního svalu*.

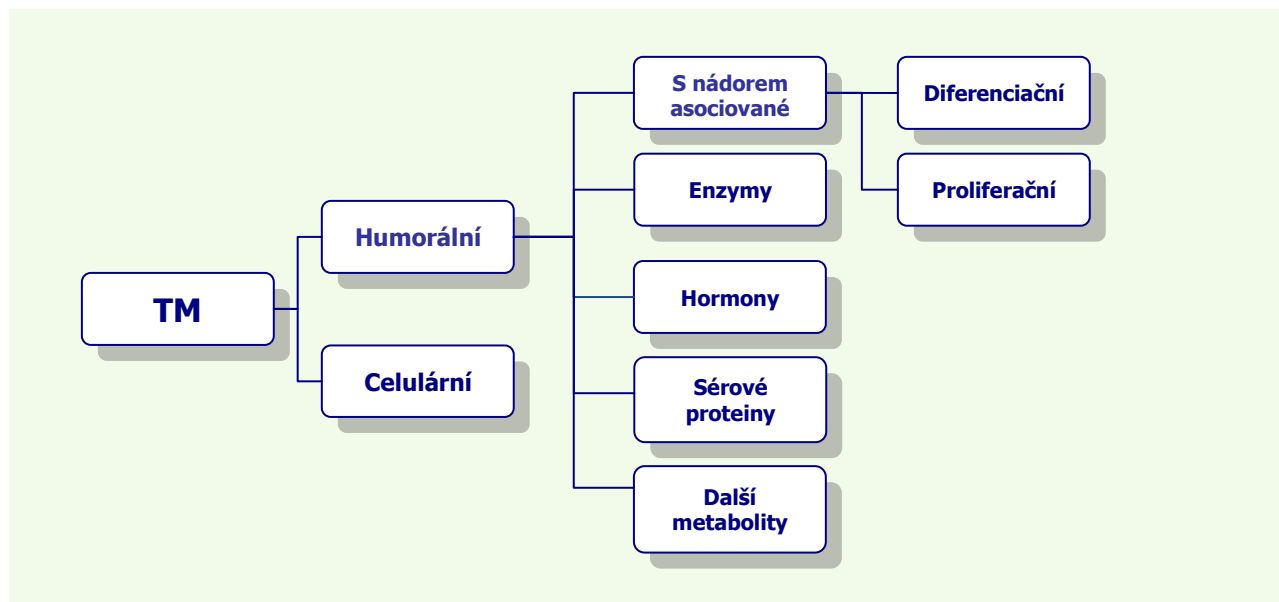
Prof. MUDr. Tomáš Žima, DrSc., Doc. RNDr. Petr Štern, CSc., Signální transdukce (část II).

Prof. MUDr. Jaroslav Masopust, DrSc., ÚKBP, 2. lékařská fakulta UK v Praze, Labor Aktuell, 02/04, str. 4-8, Nádorové markery včera, dnes a zítra (1. část)

www.roche-diagnostics.cz/download/la/0102/S%20obrazky/signalni.pdf

Další možné schéma rozdělení nádorových (tumorových) markerů (TM)

(Šimíčková, M., Nekulová, M.)



Zkratky použité v dalším textu

AFP	α -fetoprotein	tPSA	celkový PSA
β-hCG	β -podjednotka hCG	SCCA	antigen skvamózních buněk
β_2M	β_2 -mikroglobulin	SP1	β_1 -specifický glykoprotein
CEA	karcinoembryonální antigen	TK	thymidinkináza
FER	ferritin	TPA	tkáňový polypeptidový antigen
hCG	lidský choriogonadotropin	TPS	specifický TPA
MCA	antigen mucinózních karcinomů	TSH	thyreotropin
MSA	mammární sérový antigen	T3	trijódthyronin
NSE	neuron-specifická enoláza	ft3	volný trijódthyronin
PSA	prostatický specifický antigen	T4	tetrajódthyronin, thyroxin
fPSA	volný PSA	ft4	volný tetrajódthyronin

Rozdělení nádorových markerů

Nádorové markery, Šimíčková M., Nekulová M., MedProGO, 2004

I. Humorální nádorové markery

1. S nádorem asociované antigeny

▪ diferenciální, onkofetálního typu

CEA	karcinoembryonální antigen
AFP	α -1-fetoprotein
Antigeny CA [*] -typu	CA 15-3, CA 72-4, CA 19-9, CA 125, CA 50, CA 549, CA 242, CAM 26, CAM 29
MCA	antigen mucinózních karcinomů
CYFRA 21-1	fragment cytokeratinu 19
SCCA	antigen skvamózních buněk

▪ spojené s procesem proliferace

TPA/TPS	tkáňový polypeptidový antigen (specifický)
---------	--

2. Enzymy

NSE	neuron-specifická enoláza
TK	thymidinkináza
PAP	prostatická frakce kyselé fosfatázy
LD	laktátdehydrogenáza

3. Hormony

hCG	lidský choriogonadotropin
TG	tyreoglobulin
CT	kalcitonin
PRL	prolaktin
GH	růstový hormon
PTH	parathormon
ADH	antidiuretický hormon

4. Sérové proteiny

PSA	prostata specifický antigen
FER	feritin
B ₂ M	β ₂ -mikroglobulin
RAF	reaktanty akutní fáze
CIC	cirkulující imunokomplexy monoklonální imunoglobuliny

5. Další metabolity

VMK	kyselina vanilmandlová
HIOK	kyselina hydroxyindoloctová
MEL	melanogeny
UGP	močový gonadotropinový peptid
NMP-22	proteiny nukleární matrix
S-100	protein S-100

II. Celulární nádorové markery

ER, PR	receptory estradiolu a progesteronu
CD	katepsin D
HER-2/neu (=c-erbB-2)	onkoprotein HER-2/neu
p53	protein kódovaný tumor-supresorovým genem p53

^{*)} CA = carbohydrate antigen, nádorové antigeny definované na podkladě monoklonální protilátky, číslo za zkratkou charakterizuje monoklonální protilátku užitou proti tomuto antigenu v testu; zkratka „CA“ byla převzata z komerčních setů; v poslední době se zkratka vysvětluje i jako „Carcinoma antigens“

differentialis [lat.] = diferenciální, rozlišující ; **differentiatio** [lat.] = diferenciacie, různost, rozlišování, rozřídění
proliferatio [lat.] = proliferace, novotvoření, bujení, chorobný růst (např. tkáně)
proliferativus [lat.] = rostoucí, bující, charakterizovaný bujením, proliferativní, proliferační

Zkratky použité v textu

AFP	α-fetoprotein	tPSA	celkový PSA
βhCG	β-podjednotka hCG	SCCA	antigen skvamózních buněk
β₂M	β ₂ -mikroglobulin	SP1	β ₁ -specifický glykoprotein
CEA	karcinoembryonální antigen	TK	thymidinkináza
FER	ferritin	TPA	tkáňový polypeptidový antigen
hCG	lidský choriogonadotropin	TPS	specifický TPA
MCA	antigen mucinózních karcinomů	TSH	thyreotropin
MSA	mammární sérový antigen	T3	trijódthyronin
NSE	neuron-specifická enoláza	ft3	volný trijódthyronin
PSA	prostata/prostatický specifický antigen	T4	tetrajódthyronin, thyroxin
fPSA	volný PSA	ft4	volný tetrajódthyronin

Přehled některých tumorových markerů			
	Nádor	Nádorové markery	
		Diferenciační	Proliferační
Nádory zažívacího traktu	Jícnu	CA 72-4, SCCA	TPS
	Žaludku	CA 72-4, CEA	TPA, TK
	Tlustého střeva	CA 19-9, CEA	TPS
	Hepatom	AFP	-
	Žlučových cest	CA 19-9, AFP	TPS
	Pankreatu	CA 19-9, CA 72-4	TPA, TK
	Peritonea	CA 125	-
Nádory močového ústrojí	Ledvin	NSE, CEA	TPA
	Močového měchýře	CEA	TPA
	Prostaty	PSA, fPSA*)	TPS
Nádory varlat	Seminomy	AFP, β -hCG, NSE	TK
	Nonseminomy	AFP, β -hCG	TPS
Nádory prsu		CEA, CA 15-3	TPS
Gynekologické nádory	Ovárií serózní	CA 125	TPS
	Ovárií mucinózní	CA 72-4, CA 19-9	TPS
	Ovárií germinativní	AFP, β -hCG	TPS
	Těla děložního	SCCA, CA 125	TPS
	Ektocervixu	SCCA, CEA	TPS
	Endocervixu	CEA	TPS
	Vejcovodů	CA 125	TPS
Nádory plic a pleury	Epidermoidní	SCCA, CEA, CYFRA 21-1	TPS
	Malobuněčné	NSE, CEA	TPS
	Adeno Ca	CEA, CA 125	TPS
	Velkobuněčné	CYFRA 21-1	TPS, TK
	Pleury	CA 125	TPS
Maligní lymfomy	Hodgkinova choroba	β 2-mikroglobulin, ferritin	TK
	Nehodgkinské lymfomy	β 2-mikroglobulin	TPS
Hematologické malignity	Plasmocytom	β 2-mikroglobulin	-
	Leukémie	β 2-mikroglobulin, ferritin	TPS, TK
Nádory CNS	Neuroblastom	NSE	TK

Zvýšené hladiny TM v séru se mohou vyskytovat i u některých *nemaligních* onemocnění, krátký přehled je uveden v následující tabulce

Zvýšené hladiny nádorových markerů v séru u nemaligních onemocnění		
Nádorový marker	Nemaligní onemocnění	Jiná příčina
CEA (karcinoembryonální antigen)	zánětlivé choroby jater jaterní cirhóza pankreatitida	kouření
AFP (α -fetoprotein)	zánětlivé procesy plic, GIT jaterní cirhóza akutní i chronická hepatitida	těhotenství ^{*)}
TPA (tkáňový polypeptidový antigen)	infekční procesy obecně jaterní cirhóza pankreatitida	
CA 15-3	jaterní cirhóza akutní hepatitida postižení ledvinových glomerulů	těhotenství ^{*)}
MCA (antigen mucinózních karcinomů)	viz CA 15-3, výraznější	
CA 125	ovariální cysty záněty adnex choroby jater, pankreatu, žlučníku	těhotenství (1. trimestr)
CA 19-9	cirhóza jater cholelitiáza chronická hepatitida akutní a chronická pankreatitida choroby žlučových cest diabetes cystická fibróza	
CA 72-4	benigní mammární nádory	těhotenství ^{*)}
PSA (prostata specifický antigen)	benigní hyperplazie prostaty	palpace
hCG (lidský choriogonadotropin)	mola hydatidóza	těhotenství
β_2-mikroglobulin	postižení ledvin	
TK (thymidinkináza)	interference herpes-viry B ₁₂ deficiencie	
SCCA (antigen skvamózních buněk)	záněty plic poruchy ledvin, jater	
Feritin	záněty obecně poruchy metabolismu železa	
CYFRA 21-1 (CYFRA = cytokreatin fragments; detekce fragmentů cytokreatinu)	choroby urologického traktu myomy, ovariální cysty	

^{*)} Topolčan, O, Holubec, L., jr., Pecen L., Píkner R., Svobodová S.,: Changes in tumor marker values in pregnant women in their IInd trimester, Fakultní nemocnice Plzeň

Metody stanovení tumorových markerů: nejčastěji jsou to *imunochemické analýzy* na principu vazebných testů .

Charakteristika některých vybraných nádorových markerů

CEA (*karcinoembryonální antigen*)

Glykoprotein s molekulovou hmotností 180 kDa, z 55% tvořen sacharidy (heterogenní složka), z 45% bílkoviny (homogenní složka). Jsou známy 4 různé geny CEA.

Onkofetální bílkovina vyskytující se především v *epitelových buňkách trávicího ústrojí a bronchů*. V prvním trimestru je obsažen v buněčné cytoplazmě, později je součástí povrchu buněčných membrán u plodu. U dospělých je produkován velmi omezeně, v minimální koncentraci se vyskytuje v krvi, pleurálním výpotku, ascitu a likvoru, nejvyšší koncentrace jsou ve slinných žlázách.

Fyziologická funkce není známa (ani u plodu, ani u dospělých).

Biologický poločas je 14 dnů.

Norma hodnot: 0 - 5 µg/l

Hraniční hodnoty: 5 - 8 µg/l

Patologické hodnoty: > 8 µg/l

Indikace - nádory:

- zažívacího traktu (žaludku, tlustého střeva, peritonea)
- močového ústrojí (močového měchýře)
- prsu
- gynekologické nádory (ekto- a endocervixu)
- plic a pleury (epidermoidní, malobuněčné, adeno Ca)

AFP (*alfa₁-fetoprotein*)

Glykoprotein o molekulové hmotnosti asi 70 kDa. Obsahuje asi 4,5% sacharidů, patří mezi *onkofetální antigeny*, strukturou je podobný albuminu. Je produkován žloutkovým vakem a později játry plodu. Přechází i do plodové vody. Ve fetální plazmě je nevyšší koncentrace AFP mezi 10. - 13. týdnem těhotenství (asi 3 g/l), podobně v plodové vodě (v 15. týdnu asi 40 mg/l), v termínu porodu je ve fetální plazmě asi 80 mg AFP/l. Ve 2 letech je hladina AFP pod 10 µg/l, pod touto hranicí jsou i hladiny AFP u zdravých dospělých jedinců. V mateřském séru se hladina AFP zvyšuje, maxima dosahuje 1 - 2 měsíce před porodem (asi 400 µg/l).

Fyziologická funkce - u plodu zprvu nahrazuje albumin a jeho transportní funkce. U dospělých není jasná.

Biologický poločas je 3 - 6 dnů.

Norma hodnot: 0 - 5 kIU/l

Hraniční hodnoty: 5 - 10 kIU/l

Patologické hodnoty: > 10 kIU/l

Indikace – nádory:

- zažívacího traktu (hepatom, žlučových cest)
 - varlat (seminomy a nonseminomy)
 - gynekologické nádory (ovárií germinativní)
- germinom** = novotvar ze zárodečných buněk

PSA, fPSA (prostata specifický antigen, prostatický specifický antigen)

Glykoprotein s molekulovou hmotností 34 kDa, z 90% tvořen jednoduchým polypeptidickým řetězcem 238 AK a z 10% sacharidy. Patří do skupiny kalikreinů (*serinových endopeptidáz*). Je specifickým produktem prostatické tkáně zdravé i zhoubné. Je přítomen v *prostatické tekutině, seminální plazmě, ve zdravé, hyperplastické i maligní prostatické tkáni* a v *metastázách prostatického původu*. Je produkován i paraureterálními žlázami a je přítomen ve velice nízkých koncentracích i u žen. V séru je přítomen v několika formách, tři hlavní jsou: volný PSA (fPSA), vázaný na α_2 -makroglobulin a na α_1 -antichymotripsin. Volný PSA a komplex s antichymotripsinem jsou imunologicky detekovatelné.

Volný PSA, který představuje asi 15% celkového či komplexního PSA (cPSA) se vyskytuje v několika různých formách: BPSA, proPSA a jako intaktní (nezměněný). Kromě proPSA v nativní formě existují i tzv. zkrácené formy, z nichž [-2]proPSA je nejstabilnější a bude mít zřejmě i klinické využití v diagnostice nádoru prostaty.

Fyziologická funkce – PSA:

je serinovou proteázou a je zodpovědný za zkapalnění (ztekucení) semenné plazmy.

Biologický poločas: PSA 2 - 3 dny, fPSA 7 hodin

Norma hodnot PSA: 0 - 4 $\mu\text{g/l}$

Hraniční hodnoty: 4 - 10 $\mu\text{g/l}$

Patologické hodnoty: > 10 $\mu\text{g/l}$

fPSA

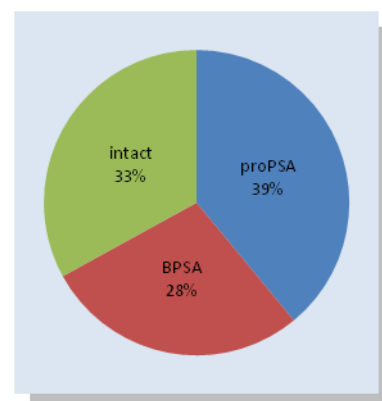
(stanovuje se u hodnot PSA 4 - 10 $\mu\text{g/l}$; hodnotí se poměr koncentrací fPSA/PSA v %)

Maligní nádor: 0 - 15%

Hraniční hodnoty: 15 - 20%

Benigní onemocnění: > 20%

Formy fPSA



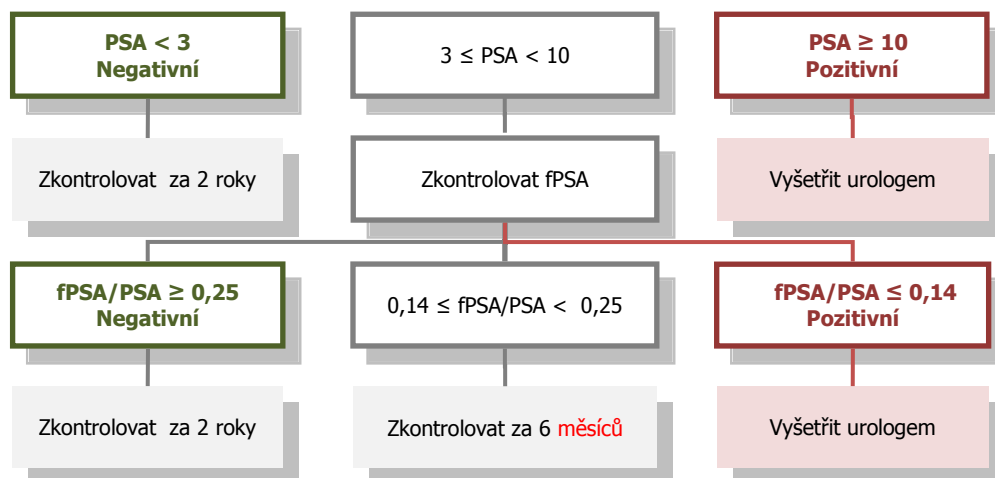
Příklad postupu při testování PSA:

Pacient (starší 40 let) odpoví na tři otázky týkající se

- *Kvality močení (včetně osobních pocitů)*
- *Výskytu rakoviny prostaty v příbuzenstvu*
- *Event. obsahu krve v moči*

Kladná odpověď na alespoň jednu z uvedených otázek znamená indikaci k vyšetření PSA podle dále uvedeného schématu.

Schéma testování PSA



Poznámka: v poslední době se význam screeningu hladiny PSA zpochybňuje; důvodem je skutečnost, že z hladin PSA se obtížně odlišuje benigní hyperplazie prostaty od zhoubného nádoru; muži se zvětšenou prostatou jsou pak přehnaně diagnostikováni a léčeni. (ZN, 43/2009, str.11)

hCG (lidský choriogonádotropní hormon viz též kreditní kurz hormony)

Glykoprotein o relativní molekulové hmotnosti asi 40 kDa. Tvoří se v trofoblastických buňkách placenty v průběhu těhotenství a stimuluje růst žlutého tělíska. V krvi a v moči se nacházejí jak intaktní molekula hCG, tak α - i β -podjednotky a štěpné produkty β -podjednotky: free- β a β -core. Biologicky aktivní je pouze intaktní molekula hCG. Pro nádorovou diagnostiku se jeví specifitější stanovování β -podjednotky (β -hCG).

Fyziologická funkce - v těhotenství slouží k imunotoleranci plodu imunitním systémem matky

Biologický poločas: 1,5 - 2,5 dne

Referenční hodnoty: 0 - 5 IU/l

Hraniční hodnoty: 5 - 10 IU/l

Patologické hodnoty: > 10 IU/l

Indikace – nádory:

- nádory varlat (seminomy i nonseminomy)
- gynekologické nádory (ovárií geminativní)

CA 15-3

Monoklonální protilátkou definovaný nádorový marker mucin-glykoproteinové struktury s molekulovou hmotností 300 - 450 kDa. Patří mezi onkofetální nádorové markery. U plodu se vyskytuje v epitelových buňkách bronchů a jater, u dospělých je povrchovým antigenem žláznových buněk ve vývodech mléčné žlázy.

Fyziologická funkce není známa.

Biologický poločas: 7 dní

Referenční hodnoty: 0 - 22 kIU/l

Hraniční hodnoty: 22 - 30 kIU/l

Patologické hodnoty: > 30 kIU/l

Indikace – nádory prsu.

CA 125

Monoklonální protilátkou definovaný nádorový marker mucin-glykoproteinové struktury s molekulovou hmotností kolem 200 kDa. Patří mezi onkofetální nádorové markery. U plodu se vyskytuje *v epitelálních buňkách dýchacího a trávicího ústrojí, u dospělých v epitelálních buňkách dýchacího ústrojí*, vysoké hodnoty se nacházejí v séru těhotných žen a v mateřském mléce.

Fyziologická funkce - během vývoje plodu funguje jako diferenciační antigen coelomových tkání

Biologický poločas: 4 dny

Referenční hodnoty:	0 - 30 kIU/l
Hraniční hodnoty:	30 - 40 kIU/l
Patologické hodnoty:	>40 kIU/l

Indikace – nádory:

- zažívacího traktu (peritonea)
- gynekologické (ovárií serózní, těla děložního, vejcovodů);
serózní ovariální nádory = patří mezi nádory z povrchového epitelu
- plic a pleury/pohrudnice (adeno Ca, pleury)

CA 19-9

Monoklonální protilátkou definovaný mucin-sialo-glykolipid s molekulovou hmotností nad 500 kDa. Patří mezi onkofetální nádorové markery. Výskyt tohoto markeru úzce souvisí s Lewis(a) determinantou krevní skupiny. U plodu se vyskytuje v epitelových buňkách trávicího ústrojí, pankreatu a jater. U dospělých je *velice omezeně produkován epitelálními buňkami bronchů a trávicího ústrojí*. V minimálních koncentracích se vyskytuje v krvi, pleurálním výpotku, ascitu a mozkomíšním moku. Eliminuje se výhradně žlučí.

Fyziologická funkce není známa.

Biologický poločas: 5 dní

Referenční hodnoty:	0 - 30 kIU/l
Hraniční hodnoty:	30 - 40 kIU/l
Patologické hodnoty:	> 40 kIU/l

Indikace – nádory:

- zažívacího traktu (tlustého střeva, žlučových cest, pankreatu)
- gynekologické nádory (ovárií mucinózní);
mucinózní ovariální nádory = patří mezi nádory z povrchového epitelu

CA 72-4

Monoklonální protilátkou definovaný glykoprotein mucinového typu s molekulovou hmotností okolo 400 kDa. Patří mezi onkofetální nádorové markery. U plodu intenzívně produkují tuto *bílkovinu povrchové epitelální struktury jícnu, žaludku a pankreatu*, u dospělých se to děje velmi omezeně.

Fyziologická funkce není známa.

Referenční hodnoty:	0 - 3 µg/l
Hraniční hodnoty:	3 - 6 µg/l
Patologické hodnoty:	> 6 µg/l

Indikace – nádory:

- zažívacího traktu (jícnu, žaludku, pankreatu)
- gynekologické nádory (ovárií mucinózní)

SCC (antigen skvamózních buněk)

Glykoprotein o molekulové hmotnosti 48 kDa, patří do skupiny onkofetálních antigenů. Je produkován dlaždicovými epidermoidními buňkami plodu i dospělých osob. Je přítomen *ve středních vrstvách epitelu*.

Fyziologická funkce - zřejmě hraje důležitou roli při diferenciaci epidermoidních tkání.

Biologický poločas: 20 minut

Referenční hodnoty: 0 - 1,5 µg/l

Hraniční hodnoty: 1,5 - 2 µg/l

Patologické hodnoty: > 2 µg/l

Indikace – nádory:

- zažívacího traktu (jícnu)
- gynekologické nádory (těla děložního, ektocervixu)
- nádory plic a pleury (epidermoidní)

NSE (neuronspecifická enoláza)

Enzym katalyzující přeměnu 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát (glykolýza). U plodu se vyskytuje v nervové a plicní tkáni, u dospělých především *v neuroendokrinních strukturách*.

Fyziologická funkce spočívá v účasti v glykolýze.

Referenční hodnoty: 0 - 10 µg/l

Hraniční hodnoty: 10 - 12,5 µg/l

Patologické hodnoty: > 12,5 µg/l

Indikace – nádory:

- močového ústrojí (ledvin)
- varlat (seminomy)
- nádory plic a pleury (malobuněčné)
- CNS (neuroblastom)

TK (thymidinkináza)

Enzym, který za přítomnosti ATP katalyzuje přeměnu thymidinu na thymidinmonosfosfát (TMP). Nazývá se též "záchranný enzym" (*salvage enzyme*). *Je to nespecifický tumorový marker schopný indikovat maligní růst v různých orgánech*. U zdravého dospělého jedince se nacházejí jen nízké koncentrace, vyšší hodnoty se mohou vyskytnout i u některých nemaligních onemocnění.

Biologický poločas: 2 dny

Referenční hodnoty: 0 - 5 U/l

Hraniční hodnoty: 5 - 10 U/l

Patologické hodnoty: > 10 U/l

TPA (*tkáňový polypeptidický antigen*)

TPS (*tkáňový polypeptidický specifický antigen*)

Fragmenty cytokeratinových podjednotek intermediárních filament. Do tělních tekutin se uvolňují pravděpodobně během proliferace nádorových buněk či během nekrózy buněk. TPA detekuje fragmenty cytokeratinů 8, 18 a 19, TPS pouze fragmenty cytokeratinů 8 a 18. *Jsou to nespecifické nádorové markery indikující maligní růst v různých orgánech.* Fyziologicky jsou produkovány trofoblastem placenty, v játrech, plicích, střevě a ledvinách vyvíjejícího se plodu. *U zdravých dospělých se TPA a TPS vyskytují v epiteliální výstelce mléčné žlázy, močového měchýře, v plicích a v orgánech trávicího traktu.*

Fyziologická funkce je nejasná.

Biologický poločas: 7 dní

TPA

Referenční hodnoty: 0 - 120 kIU/l

Hraniční hodnoty: 120 - 140 kIU/l

Patologické hodnoty: > 140 kIU/l

TPS

Referenční hodnoty: 0 - 85 kIU/l

Hraniční hodnoty: 85 - 95 kIU/l

Patologické hodnoty: > 95 kIU/l

CYFRA 21-1

Fragmenty cytokeratinových podjednotek intermediárních filament (podobně jako u TPA a TPS). Detekují se fragmenty cytokeratinu 19. Cytokeratin 19 je kyselý protein s molekulovou hmotností 40 kDa. CYFRA 21-1 se vyskytuje *v buňkách plicní tkáně, dělohy a trávicího ústrojí. Slouží jako ukazatel degradace maligních tkání a buněčné nekrózy.*

Fyziologická funkce je nejasná.

Referenční hodnoty: 0 - 2,5 µg/l

Hraniční hodnoty: 2,5 - 3,5 µg/l

Patologické hodnoty: > 3,5 µg/l

Indikace – nádory: plic a pleury (epidermoidní, velkobuněčné)

HE4

Lidský epididymální protein 4 (HE4, resp. WFDC2 – od „whey acidic four-disulfide core“ = WFDC, rodina příbuzných proteinů, „2“ v názvu odkazuje na přítomnost dvou WFDC domén), molekulová hmotnost mezi 20 – 25 kD.

epididymis [ř.] = nadvarle

whey [angl.] = syrovátka; **core** [angl.] = jádro, střed; podstata

Fyziologická funkce

Proteinová doména *whey acidic protein* (WAP) byla identifikována jako hlavní protein syrovátky (mléčného séra), který hraje důležitou roli v regulaci proliferace epiteliálních buněk mléčné žlázy. Fyziologickou funkcí je pravděpodobně aktivita obdobná aktivitě inhibitorů proteáz. *Whey acidic protein-type 4-disulphide core* (WFDC) je předpokládaným prototypem členů rodiny WAP proteinů; doména sestává z 8 cysteinových zbytků spojených disulfidickými vazbami v ustáleném uspořádání. WFDC1 (*prostate stromal protein 20 kDa, PS20*) a WFDC2 (*major human epididymis-specific protein E4, HE4*) jsou užitečnými biomarkery pro detekci tumorů.

HE4 se nachází ve vysoké koncentraci u pacientek s karcinomem ovarií. Je to jediný nádorový marker s vysokou senzitivitou pro detekci epiteliálního karcinomu ovarií (EOC), zejména v I. stadiu, kde ostatní markery selhávají. Přitom diagnostika EOC v raném stadiu vývoje nádoru je podmínkou vyléčení. HE4 je novým markerem pro ovariální karcinom, ale pro screening rakoviny vaječnicků nelze použít.

Pro posouzení rizika ovariálního karcinomu je nutno **současně stanovit hodnoty CA125 a HE4 v séru** a vypočítat tzv. **ROMA skóre**, ve kterém se berou v úvahu naměřené hodnoty CA125 a HE4 a menopauzální status u dané pacientky. ROMA™ je zkratkou *Risk Of Ovarian Malignancy Algorithm*, tj. algoritmus (postup, výpočet) pro zjištění rizika ovariální malignity. Kombinace uvedených prvků v tomto algoritmu/výpočtu, se zdá být v současnosti nejlepším testem pro zjištění rizika malignity tohoto typu: vykazuje vysokou diagnostickou senzitivitu i specifitu. Důležitá je zejména vysoká hodnota senzitivity, protože v tomto případě nebude rozpoznáno jen velmi málo nemocných (vysoké procento záchytu nemoci). Falešná pozitivita u zdravých bude vyloučena následným vyšetřením.

Referenční hodnoty:

Žena před menopausou		Žena po menopause	
≥7%	vysoké riziko nálezu EOC	≥25,3%	vysoké riziko nálezu EOC
<7%	nízké riziko nálezu EOC	<25,3%	nízké riziko nálezu EOC

Kalkulátor pro výpočet ROMA s hodnotami ARCHITECT HE4 A CA125 je na adrese: <http://southasia.abbottdiagnostics.com/Products/Instruments by Platform/roma.cfm>

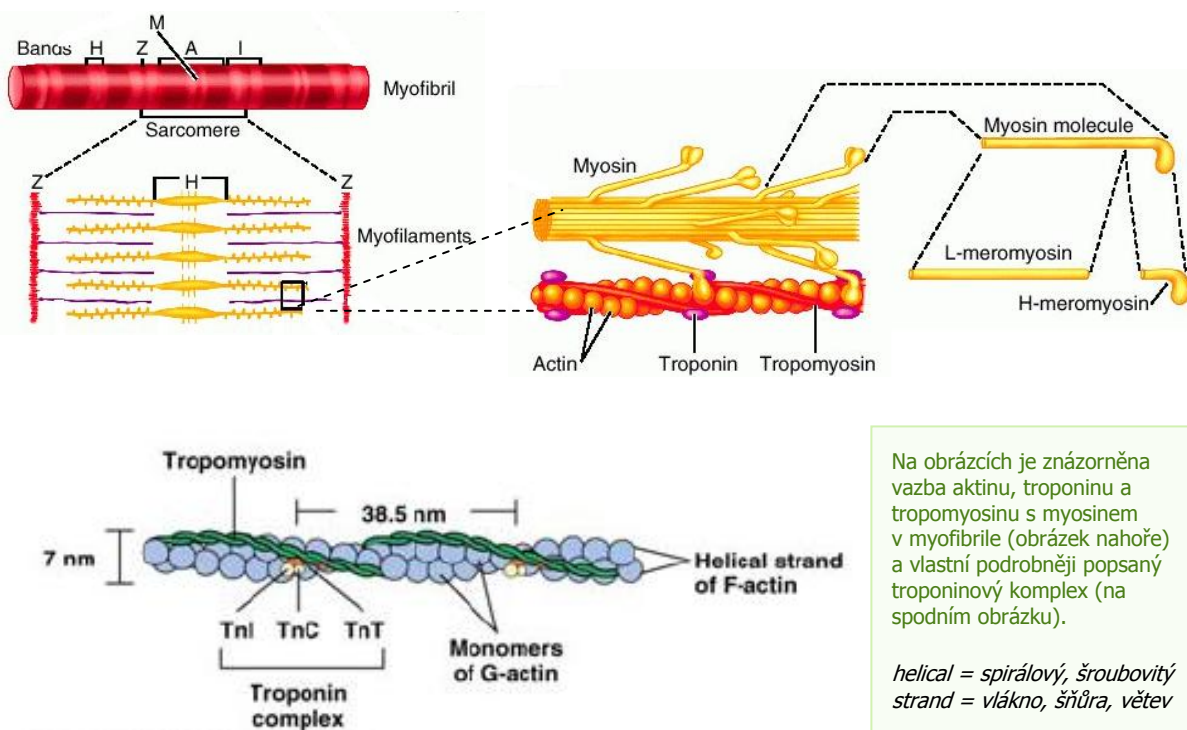
Více o tumorových markerech a stanovisko odborné společnosti ČSKB k tumorovým markerům lze nalézt na adrese: <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni--tumorove-markery>

2. Markery infarktu myokardu

Infarkt myokardu je *složitá klinická jednotka určená řadou patologických, elektrokardiografických (EKG), biochemických a klinických charakteristik*. Asi v 10% případů jsou příznaky mírné, případně žádné – jedná se o tzv. „němý infarkt“. Patofyziologicky je infarkt myokardu definován jako *akutní ložisková ischemická nekróza srdečního svalu*, během níž dochází k uvolnění řady proteinů z kardiomyocytů do krevního oběhu. Některé z nich mohou být následně detekovány jako tzv. *kardiomarkery*. I když základem diagnostiky při prvním kontaktu s nemocným zůstává stále EKG, pro definitivní diagnózu je základem **průkaz biochemických markerů**. Za markery infarktu myokardu (IM) jsou v současnosti považovány vedle *myoglobinu, CK-MB* (hlavně *CK-MB mass*) a *LD*, především *bílkoviny troponinového komplexu*.

Troponiny

Troponinový komplex je tvořen třemi strukturálními bílkovinami (troponinem T, I a C), které jsou vázány na *tropomyozin* příčně pruhovaného svalu a mají vztah k regulaci síly svalové kontrakce.



Troponiny z kosterního svalstva a ze srdečního svalu lze rozlišit *imunochemicky*.

V praxi se stanovují

- troponin T (cTnT) a
- troponin I (cTnI).

Pro troponiny je typické, že ve zdravém organismu se nevyskytují ve zvýšených hodnotách a neexistuje žádná „šedá zóna“. Výskyt troponinu (T, I) znamená, že byl poškozen myokard, i když nutně nemusí jít o IM. Např. mírně zvýšené hodnoty troponinu T u pacientů s nestabilní *anginou pectoris* svědčí o špatné prognóze onemocnění (dochází k ischemiím a následným nekrotickým myokardům). Také myokarditida, plicní embolie, srdeční selhání, septické stavy aj. mohou mít za následek zvýšení (elevaci) hladin cTn (kardiálních troponinů). V těchto případech dochází k poškození myokardu i bez přítomnosti ischemie a tyto (vzácné) skutečnosti je třeba mít na paměti při interpretaci výsledků.

Kardiální troponiny se objevují v narůstající koncentraci 3,5 – 4 hodiny po srdeční příhodě (pro cTnI se uvádí 4 – 6 hodin po příhodě), (myoglobin 0,5 – 2 hodiny po příhodě, není však specifický pro myokard), maximum je asi po 18 (cTnI 8 – 28) hodinách a návrat k původnímu stavu po 7 – 20 (cTnI 3 – 10) dnech

(troponiny se tedy nehodí ke stanovení *opakovaného infarktu*, pokud k němu dojde v průběhu několika dní po první koronární příhodě). Biologický poločas cTnI je 2 - 4 hodiny, skutečnost, že cTnI přetrvává dny po příhodě v krevním oběhu, svědčí o tom, že dochází ke kontinuálnímu vyplavování tohoto proteinu z poškozených myofilament komplexu.

Metody stanovení troponinů

Troponiny se stanovují *imunochemickými metodami* (ligandovými technikami). Na trhu nejdéle známou metodou je metoda pro stanovení *troponinu T* od firmy ROCHE (dříve Boehringer Mannheim), která má výrobu souprav pro stanovení cTnT na svých analyzátoch (např. Elecsys, Cobas) chráněnou patenty. V současnosti existuje několik firem, které dodávají na trh metody na stanovení *troponinu I* (malý protein o molekulové hmotnosti přibližně 24 kDa). Je to např. firma ABBOTT Laboratories s.r.o., která dodává soupravy pro stanovení cTnI na analyzátoru AxSym a nověji i na analyzátoch řady Architect, firma Siemens se soupravami pro analyzátoch Immulite a řada dalších firem. Referenční hodnoty se liší podle jednotlivých výrobců souprav.

V roce 2000 došlo k definování *akutního koronárního syndromu (ACS)* a bylo doporučeno používat pouze *jednu diskriminační hodnotu*, a to hodnotu 99. percentilu referenční populace s precizností stanovení $VK\% = 10$. V současnosti jsou do rutinní praxe zaváděny tzv *high sensitive – hs/HS* diagnostické soupravy (běžně se mluví o stanovení *high sensitive* troponinů), což znamená, že tyto soupravy splňují požadavky na preciznost stanovení.

Přesné uplatnění, zhodnocení a interpretace výsledků stanovení nízkých hladin troponinů v diagnostickém a terapeutickém procesu se sice stále ještě hledá a konkretizuje, ale základní představy o přínosu stanovení těchto nízkých hladin troponinů již existují: lze, s dostatečnou přesností, identifikovat menší poškození myokardu, a to dříve, tj. v časnějších fázích vývoje těchto poškození, než to dovolovaly metody předchozí: Týká se to jak akutních (AKS, plicní embolie, myokarditis apod.), tak chronických onemocnění myokardu (při srdečním selhání, u nemocných se stabilní anginou pectoris, u jedinců s prokazatelnými aterosklerotickými změnami koronárního řečiště, ale bez klinických či anamnestických symptomů aj.). Dá se shrnout, že v současnosti se přínos HS/hs metod vidí zejména ve včasnějším průkazu nekrózy myokardu, v přispěvků k rychlejší a dokonalejší diferenciaci nestabilní anginy pectoris (diferenciální diagnostika akutních koronárních syndromů) a v prognostickém významu tohoto stanovení (z charakteru změn v koncentraci troponinů v krvi lze usuzovat na riziko kardiovaskulární morbidita a mortality). Praxe mimo jiné ukázala, že je třeba stanovit **různé hodnoty cut off pro muže a pro ženy**. Kupodivu se také ukázalo, že stanovení troponinů s velmi nízkou fyziologickou koncentrací nepřineslo s sebou posun těchto hodnot, tzn., že prakticky nedochází k nárůstu (falešně) pozitivních výsledků.

Více o srdečním infarktu a troponinech lze nalézt např. na adrese: <http://www.roche-diagnostics.cz/prolekare/infark.aspx>

O vysoce citlivém (*HS = high sensitivity*) troponinu fy Siemens viz video: <http://usa.healthcare.siemens.com/clinical-specialities/cardiology/cardiovascular-disease/educational-videos-modules>.

Rovněž firma Abbott Laboratories má ve svém portfoliu hs TnI. Podrobnosti o hs troponinech a dalších kardiomarkerech lze nalézt také na adrese <http://www.ceva-edu.cz/mod/forum/search.php?id=1&search=Troponin>

Kopeptin

Kopeptin (*copeptin*) je kyselý glykopeptid složený z 39 aminokyselin, který tvoří C-terminální část prekursoru *vasopresinu*.



Pre-Pro-Vasopresin	
1	signální molekula
2	vasopresin
3	neurofyzin II
4	kopeptin (copeptin)

Je stabilním a citlivým zastupujícím markerem cirkulujícího adiuretinu/vasopresinu. Je markerem endogenního stresu a jeho hladina bezprostředně vzrůstá po ataku akutního infarktu myokardu (AMI) a pak plynule klesá. Vzhledem k tomu, že troponin, specifický marker myokardiální nekrózy vykazuje určité zpoždění v nárůstu po ataku AMI („slepá troponinová perioda“), představují tyto dvě látky svým způsobem komplementární biomarkery a jejich kombinace by mohla výrazně zrychlit diagnózu AMI, zejména v negativním smyslu, tj. vyloučením infarktu myokardu: *negativní troponin + negativní kopeptin = nejedná se o AMI*.

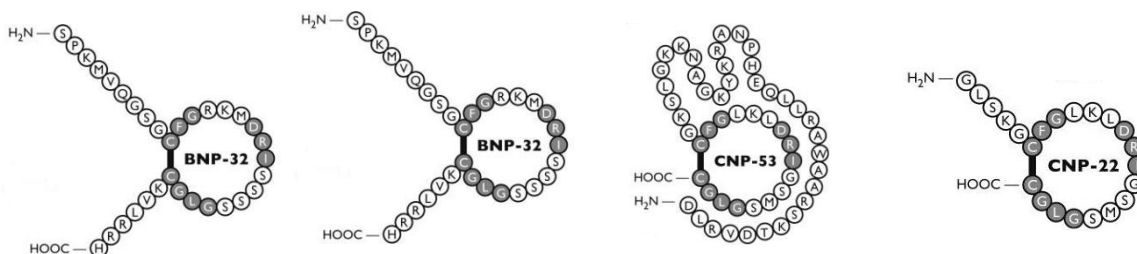
Poznámka: Potřebné reagentie vyrábí pro imunochemické stanovení na analyzátoru Kryptor fa BRAHMS a na českém trhu dodává fa Lacomed s.r.o.; ELISA soupravy vyrábí např. fa Uscn Life Science Inc.

3. Markery srdečního selhání

Srdeční selhání je *syndrom způsobovaný celou řadou různých stavů*, např. onemocněním koronárních artérií, hypertenzí, vadou srdečních chlopní, myokarditidou atd. Srdeční selhání je přesněji definováno jako *zhoršující se stav, kdy srdeční komory nejsou schopny zásobovat krví plíce a/nebo periferní oblasti těla*.

Natriuretické peptidy

Natriuretické peptidy tvoří „rodinu“ hormonálně aktivních látek, které jsou tvořeny 17členným kruhem spojeným disulfidickým můstkem a postranními řetězci, jejichž počet a délka se různí u jednotlivých zástupců. Do této rodiny se počítají i prekuzory a deriváty, které mohou mít význam buď jako hormony, nebo mají význam diagnostický, případně obojí. Známé jsou natriuretické peptidy ANP, BNP, CNP, DNP, VNP a urodilatin. Tvoří se v srdečních síních (ANP, který je zde skladován ve formě granulí), v endotelu (CNP) i v jiných tkáních



Zástupci rodiny natriuretických peptidů_ ANP, BNP, CNP-53 a CNP-22

Hlavními producenty jednotlivých peptidů jsou pro

ANP – srdeční síně a komory a ledviny

BNP – srdeční síně a komory, přičemž v komorách se tvoří řádově větší množství

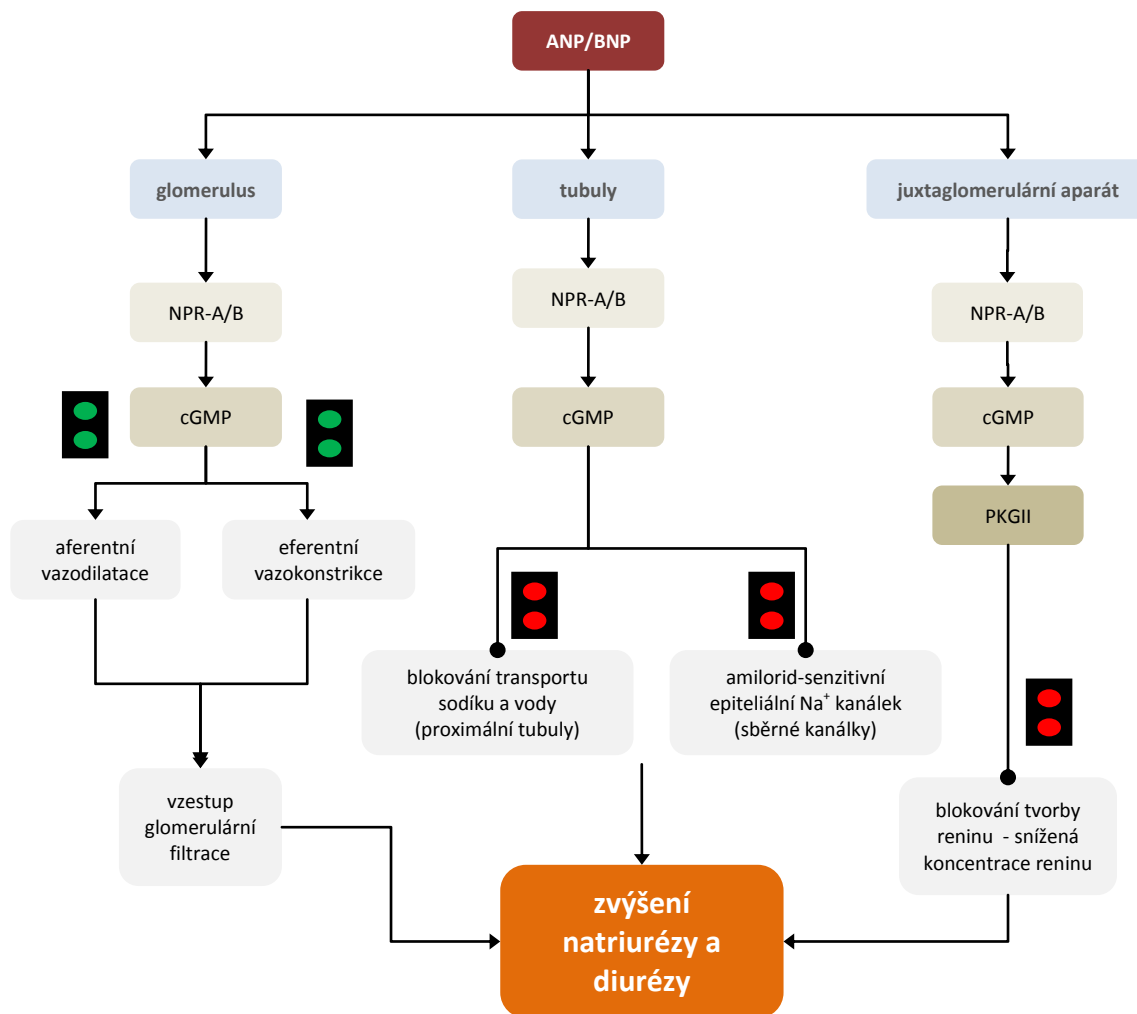
CNP – kosti, mozek, endotel, srdce

Natriuretické peptidy působí prostřednictvím receptorů v ledvinách, cévách, mozku a dalších orgánech. Ovlivňují i srdeční tkáň, hormonální systém, imunitní systém a mají i další účinky

V ledvinách ovlivňují vazodilataci a vazokonstrikci působením na svalové buňky *vas afferens* resp. *vas efferens*, relaxaci a zvýšení filtrace prostřednictvím *mesangiálních* buněk, působí také na buňky proximálního tubulu (malý vliv), buňky Henleovy kličky, distálního tubulu a sběrného kanálku. Natriuretické peptidy jsou v podstatě antagonisty systému *renin-angiotenzin*.

Schéma ovlivnění ledviny natriuretickými peptidy je na následující straně.

Ovlivnění ledviny natriuretickými peptidy je přehledně znázorněno na následujícím schématu

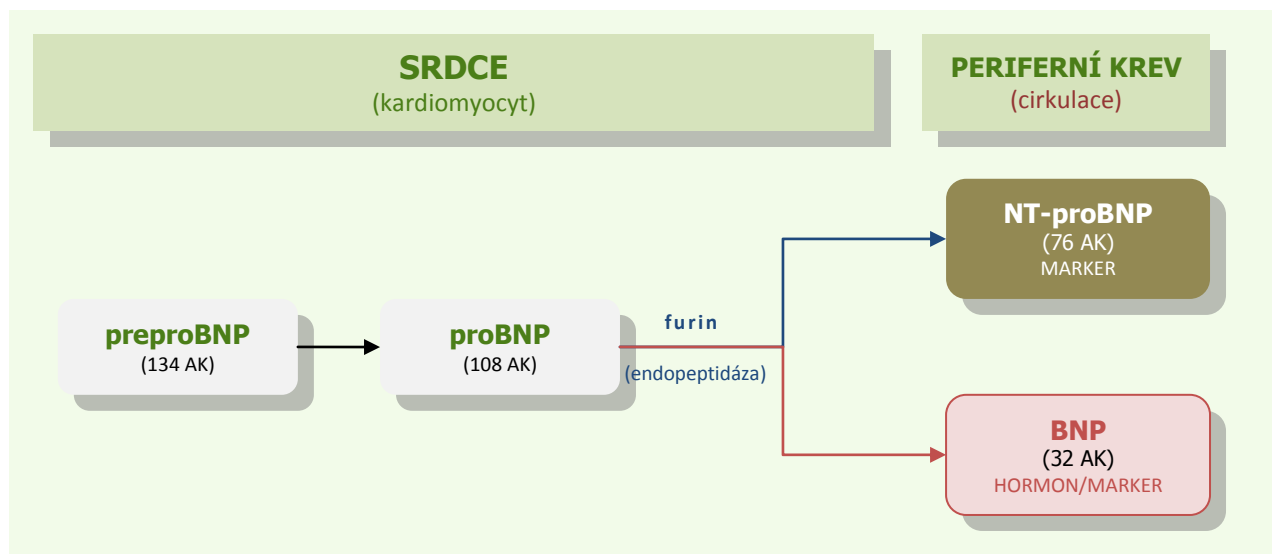


NPR-A/B : receptor pro natriuretický peptid A/B (A nebo B); **cGMP**: cyklický guanosinmonofosfát; **PKGII**: proteinkináza G typu II. **Amilorid**: slabé diuretikum, které ale snižuje ztráty draslíku močí .
Text i schéma podle Prof. MUDr. Antonína Jabor, CSc., *Natriuretické peptidy*, Roche s.r.o., Diagnostics Division, Praha, 2010; ISBN 978-80-254-7929-2, str.69-70

BNP a NT-proBNP

Markerem srdečního selhání je **mozkový natriuretický peptid** (BNP – **Brain Natriuretic Peptide**), objevený a popsáný **Boldem a spolupracovníky** v roce 1981 a **degradační fragment NT-proBNP** (**N-Terminal-prohormone BNP**). Název „mozkový“ vychází ze skutečnosti, že byl poprvé izolován z prasečí mozkové tkáně. Navzdory tomu, hlavním zdrojem BNP je srdce.

V srdečních myocytech je syntetizován *preproBNP* složený ze 134 aminokyselin a je přeměňován na molekulu *prekurzoru BNP*, tj. na *proBNP* (108 AK). *ProBNP* je dále štěpen endopeptidázou *corinem*, příp. *furinem* na fyziologicky aktivní (hormon) *BNP* (32 AK) a na degradační fragment *NT-proBNP* (76 AK). BNP je syntetizován a uvolňován do krve při **zvýšené objemové zátěži** nebo stavech způsobujících **přetížení komor**. Řídí zde homeostázu tekutin a elektrolytů interakcí se systémem *renin-angiotensin-aldosteron*, tzn. zejména *natriurézu*, čili vylučování natria močí (což současně vede k odvodnění – viz předchozí schéma), zábranu jeho resorpe (inaktivací adiuretinu), snížení tlaku zvětšením objemu cév a utlumení pocitu žízně. Výsledkem je snížení objemové zátěže organismu a optimalizace žilního návratu. Z oběhu je BNP odstraňován specifickými buněčnými receptory a neutrálními endopeptidázami, přičemž jeho biologický poločas je přibližně 23 minut. BNP s vyšší molekulovou hmotností byly detekovány v periferní krvi.



Klinické využití BNP a NT-proBNP

Četné studie naznačily, že měření BNP lze u pacienta využít ke stanovení diagnózy, prognózy a ke sledování léčby (monitorování terapie). Bylo prokázáno, že hladiny BNP jsou zvýšené u pacientů se srdeční dysfunkcí. Měření hladin BNP v plazmě poskytuje klinicky užitečné informace ohledně diagnostikování a péče při dysfunkci levé srdeční komory a srdečním selhání, čímž doplňuje ostatní diagnostická vyšetření (např. elektrokardiogramy, rentgen hrudníku a echokardiogramy). Na základě hladin BNP lze určit závažnost srdečního selhání. Hladiny BNP v plazmě se zvyšují také při snížení fyziologické funkční kapacity srdce. V podstatě totéž platí i pro NT-proBNP.

V klinické praxi jsou důležité **negativní** hodnoty testu (tzv. „*rule out*“ test, čili *vylučovací test*).

- Diagnóza srdečního selhání při hodnotách BNP <100 ng/l je nepravděpodobná,
- hodnoty BNP >100 ng/l jsou diagnostické pro *chronické srdeční selhání* a
- hodnoty BNP >500 jsou diagnostické pro *akutní srdeční selhání*.
- Srdeční selhání s hodnotami BNP >800 ng/l jsou prognosticky závažné.

Evropská kardiologická společnost (*European Society of Cardiology*) zařadila využití testování na stanovení natriuretických peptidů (např. BNP) do svých metodických doporučení pro diagnostikování nebo vyloučení srdečního selhání. Předběžné studie prokázaly možnost využití měření BNP k optimalizaci léčby a péče o pacienty po srdečním selhání. Zde je důležité srovnání hodnot BNP při příjmu pacienta a po léčbě (pro dobrou prognózu by hodnoty po léčbě měly být <100 ng/l). Diskutuje se, zda vyšetřovat BNP či NT-pro BNP; v odborném tisku i na odborných setkáních jsou probírány přednosti i záporné stránky obou metabolitů, výhody či nevýhody jejich stanovení.

Základním využitím BNP je „diferenciální diagnostika dušnosti“. Týká se dušných pacientů, kdy klinický nález nemusí být jasný, ba dokonce jsou takové rozpaky poměrně časté a lékař má rozhodnout, zda primární porucha spočívá v poruše funkce srdce nebo plic. Stanoví se hladina BNP, při zvýšené hodnotě je dušnost z kardiální příčiny.

Metodami stanovení pro BNP i NT-proBNP jsou **ligandové techniky** (soupravy ABBOTT pro stanovení BNP na analyzátoch AxSym a Architect, soupravy firmy Roche pro stanovení NT-proBNP na analyzátoru Elecsys, Cobas a jiné)

DC146

Novým markerem akutního srdečního selhání je DC146, známý také pod názvem *melanoma cell adhesion molecule (MCAM, adhesní molekula melanomových buněk)*, objevený belgickou firmou Pronota NV z Ghentu. DC146 doplňuje BNP a NT-proBNP, jeho plné využití je však ještě ve stadiu zkoumání.

Více o srdečním selhání a natriuretických peptidech viz např. na adrese:

<http://www.roche-diagnostics.cz/prolekare/srdecni.aspx>,

resp. <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni--kardialni-markery#5>

3. Markery zánětu

Každý organismus si chrání svoji celistvost, svou integritu. Při poškození odpovídá organismus *zánětem* což je, řečeno ústy imunologa¹,

„jedinečný a fylogeneticky nejstarší typ obranné a reparační reakce, kterou organismus odpovídá na poškození různými noxami. Úkolem zánětlivé reakce je destrukce a odstranění poškozujícího agens, lokalizace zánětlivých dějů na místo poškození, podpora specifické imunitní odpovědi a regenerace poškozené tkáně“.

Poškozujícími agens mohou být různé škodlivé infekční i neinfekční stimuly, jakými jsou *bakteriální infekce, viry, paraziti, houby, toxiny, cizorodé látky (bílkoviny, pyl, silikát...), tkáňové nekrózy (způsobené nádorem, anoxií, popáleninami...), záření, extrémní teploty, trauma, tělu vlastní noxy (rozpadající se nádorové buňky, extravaskulární krev, autoimunitní reakce, krystaly vzniklé vypadnutím z roztoku látek tělu vlastních – kyselina močová, štávelan vápenatý, cholesterol...)*, atd. Smyslem zánětlivé reakce je, jak již bylo uvedeno, zničení a odstranění poškozující příčiny a obnova původního stavu, regenerace poškozené oblasti, v horším případě alespoň ohraničení poškozené oblasti a eliminace příčiny.

Při zánětu dochází k mnoha změnám jak v postižené oblasti (*lokální reakce* – bolest, otok, zarudnutí, zvýšení teploty), tak často i ve vzdálených tkáních a orgánech těla. Dostatečně silný zánět vyvolá *celkovou reakci organismu*, odpověď systému, tj. organismu, na zánět, vyvolá systémovou odpověď (*Systemic Inflammatory Response*) což znamená, že organismus se začne bránit jako celek. Průvodními jevy systémové odpovědi jsou horečka, buněčná odpověď (leukocytóza), hormonální odpověď (produkce cytokinů, stresových hormonů, aj.), změna koncentrace tzv. *reaktantů akutní fáze*, což jsou bílkoviny produkované játry.

Systémovou odpověď se zabývaly [American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine](#), které v roce 1992 stanovily kritéria pro *Syndrom systémové zánětlivé reakce (SIRS, Systemic Inflammatory Response Syndrome)*, což je *nespecifická zánětlivá reakce celého organismu*. Je důsledkem každého primárního inzultu, jehož intenzita způsobí poškození, které se neomezí pouze na vlastní zasaženou ohraničenou oblast. SIRS je charakterizovaný nejméně dvěma z následujících kritérií:

- teplota nad 38 °C nebo pod 36 °C
- tepová frekvence nad 90/min
- dechová frekvence nad 20/min nebo P_{CO_2} pod 4,3 kPa (32 torr)
- leukocyty nad $12 \cdot 10^3/\mu l$ nebo pod $4 \cdot 10^3/\mu l$ nebo víc jak 10 % nezralých forem.

Při SIRS dochází ke ztrátě kontroly nad normální zánětovou odpovědí, zánět ztrácí svůj původní obranný charakter a mění se v delokalizovaný a deregulovaný autoagresivní proces. Je to závažný stav, který může nastat jak na infekční, tak neinfekční podnět. SIRS s akutní orgánovou dysfunkcí se označuje jako **závažný SIRS**.

Septický SIRS, tj. SIRS vyvolaný, nebo provázený diseminovanou mikrobiální infekcí, se nazývá **seps**.

Těžká seps je spojena s orgánovou dysfunkcí, hypoperfúzí tkání nebo hypotenzí.

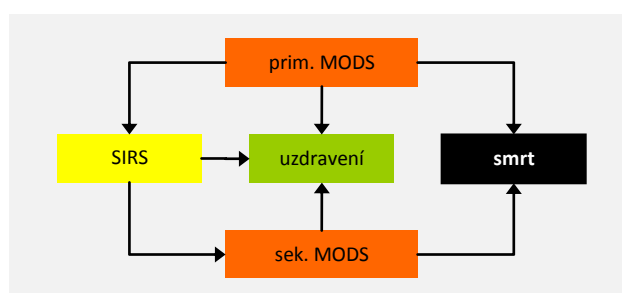
Septický šok je těžká seps s hypotenzí, která nereaguje na doplnění objemu, projevují se známky hypoperfúze.

V zánětlivé odpovědi jsou produkovány dva typy mediátorů – s **prozánětlivými** a s **protizánětlivými** účinky, jejichž vzájemný poměr je nutno zpětnovazebnými mechanismy udržet na úrovni umožňující omezit zánětovou reakci pouze na oblast poškozených tkání.

- **Nadměrná zánětlivá odpověď (hyperaktivní SIRS)** vede k nárůstu prozánětlivých mediátorů (je přítomna „cytokinová smršť“, *cytokine storm*), výsledkem je generalizovaný systémový prozánětlivý stav, dochází k rozvratu tkáňového metabolismu a cirkulace, stresovému katabolismu a posléze k selhání orgánů.
- **Nadměrná protizáněťová odpověď (syndrom kompenzační protizáněťové odpovědi, CARS)**, nepřiměřená obrana organismu, má, podobně jako nepřiměřená obrana v občanském životě, neblahé následky. Vede k nárůstu protizánětlivých mediátorů, výsledkem je inhibice buněk a mechanismů nespecifické i specifické imunity, imunosuprese s nekontrolovaným množением mikroorganismů, průnik patogenů z intestinálního traktu a rozvoj sepse, septického šoku a posléze selhání orgánů.

¹ MUDr. Karel Nouza? DrSc., <http://www.anamneza.cz/Zanet-obecne-Zanet/nemoc/237>

- Dynamická rovnováha mezi SIRS a CARS procesy vyúsťuje ve stav zvaný *syndrom smíšené antagonistické odpovědi (MARS)*, kdy výsledným obrazem je kombinace syndromů SIRS a CARS s různými projevy obou těchto komponent.
-
- SIRS i septický SIRS (sepsis) mohou vést (mechanismy popsány výše) k selhání životně důležitých orgánů, tj. k rozvoji MODS a ke smrti.
-
- **MODS** (*multiple organ dysfunction syndrome*, česky *syndrom multiorgánové dysfunkce*) je známý také pod dřívějším označením jako **MOF** (*multiple organ failure*), případně i jako **MSOF** (*multisystem organ failure*). MODS se poměrně často vyskytuje u pacientů léčených na JIP, léčba musí být komplexní a je nákladná. Jedná se o stav s poruchou funkce dvou a více životně důležitých orgánů u akutně nemocného pacienta, kdy tělo nedokáže zajistit homeostázu bez zevní intervence. Může se jednat o následek primárního poškození orgánů, např. úrazem (*primární MODS*), častěji se však jedná o těžké poškození na vzdáleném místě, sekundárně vyvolané primárním poškozením (*sekundární MODS*). Typické pro MODS jsou *hyperkinetická cirkulace* a *hypermetabolismus*.
-
- Vztahy mezi SIRS a MODS jsou mnohotvárné, mezi standardní patří vývoj SIRS v sekundární MODS, případně vývoj primárního MODS do SIRS. SIRS i MODS mohou vyústit v uzdravení i smrt.
-
- Jak vidno, zánět je sice nejvýznamnější obranou, ale také sebepoškozující reakcí organismu. Nekontrolovaná, či špatně kontrolovaná zánětlivá odpověď může vést nakonec ke smrti.
-
- Včasná a správná diagnostika SIRS jsou z klinického hlediska velmi důležité předpoklady úspěšné léčby těchto stavů. Uvádí se, že každý třetí pacient postižený sepsí umírá, incidence sepse za poslední léta, navzdory značnému množství nových léčebných postupů, soustavně roste a počet úmrtí na sepsi v zemích západního typu je v souhrnu větší než počet úmrtí na zhoubné nádory prsu, plic a gastrointestinálního traktu dohromady. Vzhledem ke komplikovaným vztahům v SIRS je léčba tohoto onemocnění velmi obtížná a v rozvinuté fázi (momentálně) nemožná. Jsou tedy zapotřebí *včasné markery nástupu SIRS* a sepse.
-
- V současné době jsou jako markery k dispozici zejména *proteiny akutní fáze* a *cytokiny* (markery zánětu), k určení SIRS a septického stavu pak *prokalcitonin (PCT)* a *presepsin*.



Proteiny akutní fáze

Časná fáze systémové zánětlivé reakce byla nazvána **reakcí** či **odpovědí akutní fáze** (*APR, acute phase reaction*) a zahrnuje *sérii lokálních a systémových klinických, biochemických a buněčných změn*.

Odpovědi akutní fáze zahrnují:

- *změny v koncentracích proteinů syntetizovaných v játrech* (tzv. *proteinů* či *reaktantů akutní fáze*)
- *změny v neuroendokrinním systému* (horečka, spavost, nechutenství, nárůst CRH, ACTH, argininu, vazopresinu, produkce stresových hormonů - katecholaminů, kortizolu, pokles T3 a T4 aj.)
- *změny v hematopoeze* (anémie, leukocytóza, trombocytóza)
- *změny v metabolismu* (negativní dusíková bilance, útlum glukokoneogeneze, aktivace i útlum enzymatických dějů, snížení koncentrací zinku a železa, zvýšení koncentrace mědi, retinolu a glutathionu, osteoporóza, zvýšení lipolýzy v tukové tkáni, kachexie).

Mezi *proteiny (reaktanty) akutní fáze* se řadí proteiny, jejichž koncentrace v plazmě se v akutní fázi zánětu změní (minimálně o 25%). Některé proteiny vykazují zhruba 50% změnu (nárůst ceruloplasminu) jiné vykazují změnu mnohonásobně vyšší, až tisícinásobnou (CRP, amyloid A).

Produkce proteinů akutní fáze je spouštěna řadou *cytokinů* (kapitola 14 *Hormony*, str. 14-45), uvolňovaných převážně aktivovanými buňkami monocyto-makrofágové řady, zúčastněnými v zánětlivé reakci. Různé

cytokiny a jejich působení se vzájemně kombinují a výsledným efektem je aditivní, synergický nebo inhibiční efekt (např. pro indukci tvorby CRP je nutná součinnost IL-6 s IL-1 nebo IL-6 s TNF- α).

V akutní fázi zánětu se uplatňují zejména IL-6 (nejvýznamnější stimul pro většinu proteinů akutní fáze), IL-1b, TNF- α , IFN-g, TGF- β a IL-8.

Rozlišují se pozitivní a negativní reaktanty akutní fáze.

Pozitivní reaktanty akutní fáze

Koncentrace těchto reaktantů/bílkovin se v akutní fázi **zvyšuje** (\uparrow) (proto tzv. „pozitivní“ reaktanty akutní fáze).

Patří sem

- *inhibitory proteáz* (α_1 -inhibitor proteáz, α_2 -makroglobulin),
- *složky koagulačního a fibrinolytického systému* (fibrinogen, plazminogen, tkáňový aktivátor plazminogenu, protein S aj.),
- *CRP* (C-reaktivní protein, tj. protein reagující s polysacharidem pneumokoků C),
- *transportní bílkoviny* (ceruloplasmin, haptoglobin, hemopexin),
- *některé složky komplementového systému* (C3, C4, C9, inhibitor C1, lektin vázající manózu) a
- *některé další* (ferritin, sérový amyloid A, orosomukoid, apod.).

Nejrychleji reaguje CRP, jeho koncentrace stoupá nejvíce (tzv. reaktanty akutní fáze s rychlou odpovědí).

Negativní reaktanty akutní fáze

Koncentrace těchto bílkovin se v akutní fázi **snižuje** (\downarrow). Typickými představiteli jsou albumin, prealbumin, transferin, alfa-fetoprotein, globulin vázající tyroxin aj.

Klinické využití proteinů akutní fáze

Mnohé reaktanty akutní fáze se stanovují jak u akutních, tak u chronických zánětů.

C-reaktivní protein (CRP)

CRP je z proteinů akutní fáze v praxi užíván asi nejvíce. Biologickou funkcí CRP je vazba na mnoho endogenních i exogenních ligandů. Jedná se o poškozené vlastní buňky a jejich produkty, které by mohly působit jako alergeny, z exogenních ligandů opsonizuje mikroorganismy. Syntézu CRP podporuje zvýšená hladina cytokinů (prozánětlivé mediátory), zejména IL-6. V případě poškození organismu je při vypuknutí zánětlivé reakce syntetizován v hepatocytech a uvolňován z nich do krve.

Plazmatické hodnoty CRP jsou

- *zvýšeny* u zánětů, infarktů, malignit, cholestázy, hypotyreózy a
- *sníženy* např. u Wilsonovy choroby, nefrotického syndromu a malnutrice.

Mírně zvýšené hodnoty indikují přítomnost chronického zánětu.

Referenční hodnoty CRP: ≤ 3 mg/l

Hodnoty >100 mg/l provázejí *bakteriální* infekce, u virových infekcí bývají hodnoty < 50 mg/l.

Sledování nízkých (mírně přesahujících referenční) hodnot CRP (soupravami hsCRP, *high sensitive CRP*, vysoce senzitivní CRP) jako ukazatelů chronického zánětu spolu s markery aterosklerózy (celkový cholesterol, HDL- a LDL-cholesterol a triacylglyceroly) má význam pro *odhad rizika koronární příhody a rizika ischemické mozkové příhody* (srovnej s článkem *Ateroskleróza* v kapitole 11 *Lipidy*, na str.11-27).

Prokalcitonin (PCT)

je polypeptid, prekurzor kalcitoninu. Citlivý indikátor bakteriální infekce, zejména těžkých sepsí. PCT, který se nachází během zánětu v plazmě, není produkován *C-buňkami* štítné žlázy, jeho hlavním zdrojem jsou hepatocyty, produkují ho však i další buňky různých orgánů.

Kvantitativně lze stanovit imunochemicky, semikvantitativně na principu imunochromatografie.

Kolorimetrická stupnice semikvantitativního imunochromatografického testu fy BRAHMS (viz obrázek vpravo) má čtyři rozlišující hodnoty:

$< 0,5$ $\mu\text{g/l}$ $\geq 0,5$ $\mu\text{g/l}$ ≥ 2 $\mu\text{g/l}$ ≥ 10 $\mu\text{g/l}$

jejichž interpretace je uvedena v tabulce na následující straně.



Interpretace hodnot PCT

Pacienti	PCT ($\mu\text{g/l}$)
Normální osoby	< 0,5
Chronické zánětlivé procesy a autoimunitní choroby	< 0,5
Virové infekce	< 0,5
Malé bakteriální lokální infekce	< 0,5
SIRS, polytraumata, záněty	0,5 - 2
Závažné bakteriální infekce, sepse, multiorgánové selhání (MODS)	> 2 (často 10 - 100)

Dynamika PCT je rychlejší než dynamika CRP, užívá se zejména jako marker sepse, i když k jeho zvýšení dochází i při izolovaném postižení jednoho orgánu zánětem.

Presepsin

(solubilní CD14 subtyp, sCD14-ST) je v literatuře uváděn jako nový marker sepse. Na povrchu buněčných membrán monocytů a makrofágů je exprimován receptor CD14, který má vysokou afinitu k lipopolysacharidu (LPS) a LPS vázajícím proteinům (LPBP). Vazbou LPBP komplexu na receptor se aktivuje TLR4-specifická prozánětlivá signalizační kaskáda a tím začíná zánětlivá reakce hostitele proti infekčnímu agens. Komplex LPS-LPBD-CD14 je uvolňován do krevního oběhu a vlivem plazmatických proteáz štěpen na stanovitelný (rozpuštěný) sCD14-ST, presepsin. Bylo zjištěno, že hladiny presepsinu jsou signifikantně vyšší u septických pacientů než u pacientů se SIRS. Z prvních srovnávacích měření se jeví, že presepsin reaguje citlivěji na sepsi než PCT a mohl by být použit pro časnou diagnostiku sepse, její prognózu a ke sledování průběhu onemocnění a odpovědi na léčbu. Protilátka proti presepsinu je základem imunochemického stanovení, které nabízí v ČR fa Medesa, pod názvem PATHFAST Presepsin.



Diskriminační hodnota pro rozlišení zdravých a nemocných se sepsí je 337 ng/l. Hodnota 1858 ng/l predikuje vysokou pravděpodobnost mortality (60%).

Sérový amyloid A (SAA) je sumární název pro skupinu plazmatických lipoproteinů; součást HDL3, prekurzor amyloidu A. Existuje několik variant SAA, biologická funkce není zcela poznána. Je syntetizován zejména v játrech, v aktivovaných makrofázích a fibroblastech. Významný pozitivní reaktant akutní fáze, může sloužit i jako test poskytující informaci o možných komplikacích v časném pooperačním období. Paralelní stanovení SAA s CRP zvyšuje citlivost vyšetření proteinů akutní fáze a umožňuje časné stanovení nástupu zánětlivého procesu (např. neonatální sepse).

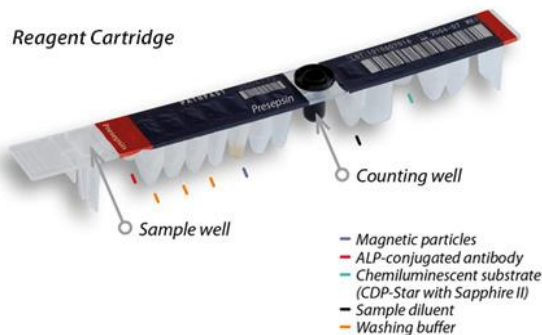
Referenční hodnoty do 6,4 mg/l.

IL-6, cytokin syntetizovaný v monocytech, fibroblastech, endoteliálních buňkách, keratinocytech, T-buňkách a v mnoha tumorových buňkách. Působí prozánětlivě, indukuje syntézu proteinů akutní fáze, působí také jako diferenciační faktor pro B-lymfocyty a aktivační a diferenciační faktor pro T lymfocyty. Zvýšené hodnoty se vyskytují u sepse, autoimunitních onemocnění, lymfomů, AIDS, rejekcí transplantátů aj. V kombinaci s CRP, resp. SAA je nejlepším markerem novorozenecké sepse.

Referenční hodnoty do 11 ng/l

Elastáza z granulocytů, enzym, který má využití při diferenciací diagnostice zánětů včetně bakteriálních.

Neopterin, purinový derivát produkovaný makrofágy. Měřítka aktivace buněčné imunity.



Cartridge („strip“) pro stanovení presepsinu na přístroji PATHFAST

4. Markery akutního selhání ledvin

Stanovení kreatininu (nejčastěji reakcí Jaffé z roku 1886) je doposud jedinou stálící na „nebi“ biochemického sledování funkčního stavu ledvin. Akutní poškození a selhání ledvin však představují závažný problém současné medicíny a úspěšná léčba v těchto případech více než jinde závisí na včasné diagnostice, nejlépe již ve fázi počínajícího rozvoje poškození. Objev nových biomarkerů vhodných pro časnou diagnostiku akutního poškození a selhání ledvin by byl určitě významným přínosem jak pro lékaře, tak pro pacienty.

Kritéria pro hodnocení poškození ledvin

Akutní selhání ledvin (ASL) bylo do roku 2004 definováno asi 30 formulacemi, pak bylo nahrazeno definicí jedinou a stanovena stadia onemocnění, podle kritérií RIFLE.

RIFLE je akronym, složený ze začátečních písmen slov charakterizujících stav ledviny:

- **R**isk, riziko (poškození)
- **I**njury, poškození
- **F**ailure, selhání
- **L**oss, ztráta (funkce)
- **ESRD**, End-Stage Renal Disease, konečné stadium ledvinového onemocnění .

Základními laboratorními charakteristikami definujícími stadia poškození ledvin jsou hodnoty sérového kreatininu a diuréza. Jednotlivým kritériím odpovídají hodnoty sérového kreatininu a diurézy.

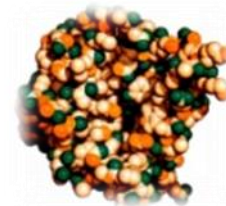
V roce 2007 byl název *akutní selhání ledvin* (ASL) nahrazen pojmem *akutní poškození ledvin* (*Acute Kidney Injury, AKI*) a bylo doporučeno poněkud upravit stávající kritéria RIFLE: místo **R**, **I** a **F** používat 1, 2 a 3, **L** a **E** opustit.

AKI se rozumí „náhlý (během 1 – 7 dnů) a přetrvávající (více jak 24 hodin) pokles ledvinových funkcí“.

Některé příčiny akutního selhání ledvin vyžadující dialyzační léčbu (pouze ilustrativní vyjmenování):

- chirurgické (operativní výkony, močová obstrukce, pankreatitidy, popáleniny)
- interní (sepsy, akutní postižení jater)
- přímé postižení renálního parenchymu (glomerulonefritidy, hemolyticko-uremický syndrom)
- gynekologické
- otravy

U všech případů, které přináší riziko AKI, je žádoucí mít k dispozici biomarker, který zavčas upozorní na hrozící nebezpečí. Jako velmi nadějný z tohoto pohledu se jeví nový marker z rodiny lipokalinů, malých sekrečních proteinů účastnících se převážně transmembránových přenosů lipofilních substancí, **neutrofilní lipokalin asociovaný s gelatinasou (NGAL)**, jehož hladina v moči i v plazmě se oproti hladině S-kreatininu v případě hrozícího AKI zvyšuje podstatně rychleji, řádově v hodinách. Základní zkušenosti v klinické praxi však teprve musí přijít. Jako první začala dodávat vazebný test firma Abbott pro systémy Architect.



NGAL
model molekuly

Další, snad perspektivní, molekulou je **molekula poškození ledvin 1 (KIM-1; kidney injury molecule)**, transmembránový protein, jehož proteolyticky upravená molekula se dostává do moči při ischemickém nebo nefrotoxickém AKI. Je zřejmě poměrně specifická právě pro ischemické poškození ledvin a může sloužit k diferenciální diagnostice typu poškození ledviny.

O *cystatinu C* byla již zmínka v kapitole 7. *Metabolity*, v odstavci věnovanému kreatininu a kreatininové clearance. V tomto případě se jedná o citlivý ukazatel poklesu glomerulární filtrace, nikoliv o ukazatel vlastního poškození ledvin.

Interleukin 18 (interleukiny viz kapitola 14 *Hormony*, str. 14-45 až 14-47) je poměrně specifický ukazatel ischemického poškození ledvin a nabízí i prognostické informace týkající se závažnosti a mortality již v době stanovení diagnózy AKI.

Podrobnosti k problematice viz Prof. MUDr. Vladimír Teplan, DrSc., RNDr. Jan Trbušek, Ph.D., *Akutní oškození a selhání ledvin: nové biomarkery v časně diagnostice, Postgraduální medicína, 2010, 12, č. 9*

5. Markery metabolismu kostí

Kost je pevná pojivová tkáň, která tvoří převážnou část kostry většiny obratlovců. Skládá se z organických látek (buňky a matrix) a z látek anorganických či minerálních. Matrix je tvořena především *kolagenem*. V matrix jsou uloženy minerální látky, tj. Ca^{2+} , fosfát, ve formě hydroxylapatitu ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), uhličitánů (Ca^{2+}), Mg^{2+} a Na^+ , které dávají kosti pevnost.

Χολαγενε, *colagené* (ř.) = *klihodárný*

Principy metabolismu kostí

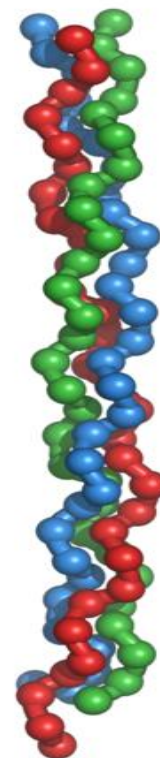
Kolageny jsou proteiny v lidském organismu nejvíce zastoupené (asi 1/3 všech proteinů). Jako strukturální bílkoviny jsou hlavní organickou složkou kostí, vazů, chrupavek, šlach, vaziva a kůže, tedy podpůrného systému živočišného organismu. Navíc jsou významnou složkou cévních stěn, bazálních membrán, rohovek a některých orgánů těla. Patologické a degradační formy kolagenu jsou příčinou řady nemocí pojivových tkání (skupina tzv. *kolagenových chorob*), které postihují klouby, srdce, cévy, svaly, kůži. Kolagen hraje významnou roli i v procesu stárnutí.

Dosud je známo nejméně 27 různých typů kolagenů (typ I až typ XXVII): Typy

- I, II, III, V, XI, XXIV a XXVII tvoří vlákna
- IV, VIII a X tvoří síť
- XIII, XVII, XXIII a XXV jsou transmembránové kolageny
- IX, XII, XIV, XIX, XX, XXI a XXII tvoří rodinu *Fibril-associated collagens with interrupted triple helix* (s vláknem spojené/asociované kolageny s přerušenou trojitou šroubovicí, tzv. FACIT). Tyto relativně krátké kolageny se nacházejí na povrchích kolagenových vláken (fibril), které spojují s ostatními molekulami matrix.
- XV, XVIII, XXVI a XXVIII - o těchto kolagenech se toho ví poměrně málo.

Nejvíce jsou zastoupeny typy I, II a III. V kostech se nachází *výlučně typ I*, který se tvoří ve fibroblastech a osteoblastech. Všechny typy kolagenu mají strukturu *trojitě šroubovice*, tzn., že tři peptidické řetězce se stáčí podobně jako lano a vytvářejí tyčinkovitou strukturu, molekulu kolagenu. Každá polypeptidová podjednotka (*α-řetězec*) je stočena do *levotočivé spirály*, tři alfa řetězce jsou vzájemně stočeny do *pravotočivé šroubovice*. Alfa řetězce v molekule mohou být stejné, nebo různé. Např. v *kolagenu I* jsou dva řetězce stejné a jeden odlišný. Molekuly kolagenu se skládají do větších svazků – kolagenových vláken (fibril), kde jsou jednotlivé molekuly kolagenu vzájemně posunuty o 1/4 své délky a vzniká tak příčně pruhovaná struktura.

Spirálové vlákno kolagenu

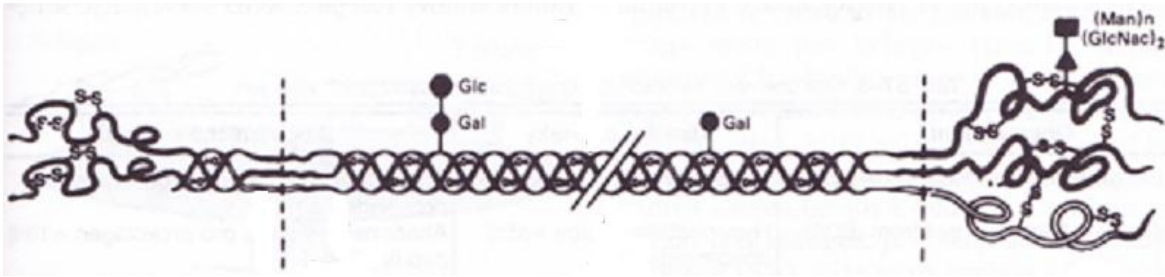


Syntéza kolagenu obecně vychází z *prokolagenu*.

První částí nového peptidového řetězce je *vedoucí* či *signální sekvence* na *N-terminálním* konci, která zodpovídá za nasměrování vytvořeného *pre-pro-peptidu* (*pre-pro-kolagenu*) do endoplazmatického retikula, kde dochází k postranlačním změnám a tvoří se *α-peptid*: signální peptid na *N-terminálním* konci je odstraněn a vzniklá molekula se nazývá *propeptid* (nikoliv *prokolagen*). *Prolylhydroxyláza* a *lyzylhydroxyláza* hydroxylují prolin a lyzin za vzniku hydroxyprolinu a hydroxylyzinu, což dále umožňuje stočení řetězců a tvorbu příčných vazeb (*cross-links*) mezi *α-peptidy*. Při těchto enzymatických reakcích je vyžadována přítomnost vitamínu C (kyseliny askorbové) jako kofaktoru. Pokud by k hydroxylacím nedošlo, nevytvořila by se trojitá šroubovice.

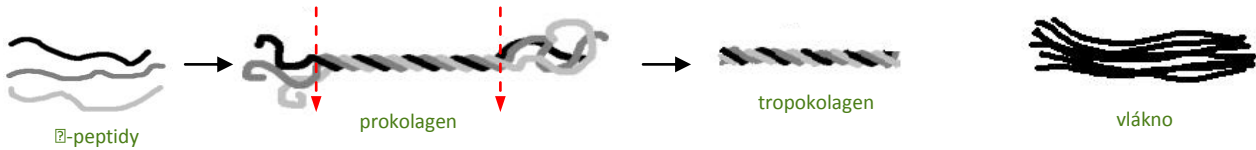
Dalším krokem je vazba (glykosylace) glukosových nebo galaktosových monomerů na hydroxylovou skupinu lyzinu. Poté dojde ke stočení tří (hydroxylovaných a glykosylovaných) peptidů do těsně utažené trojšroubovice, která má jak na *N-konci*, tak na *C-konci* volné části řetězců, tzv. *extendující (extenzní) řetězce* (u kolagenu typu I je to na *C-konci* část o asi o 320 aminokyselinách a na *N-konci* asi o 180 aminokyselinách, střední, zkroucená část, má 1050 aminokyselin). Tato molekula se nazývá *prokolagen*. Prokolagen je dopraven do Golgiho aparátu, kde jsou navázány *oligosacharidy* (rozdíl od *monosacharidů* v předchozím kroku) a potom je prostřednictvím transportních vesikul takto upravená molekula vylučována z buňky do extracelulárního prostoru, kde úprava molekuly pokračuje.

Prokolagenpeptidasami jsou odštěpeny *C-koncové* a *N-koncové* části (PICP, prokolagen-I-C-terminální propeptid, PINP, prokolagen-I-N-terminální propeptid) a zůstane střední část, tj. *kolagenová molekula*, která se také nazývá *monomer kolagenu* nebo starším názvem též *tropokolagen*.

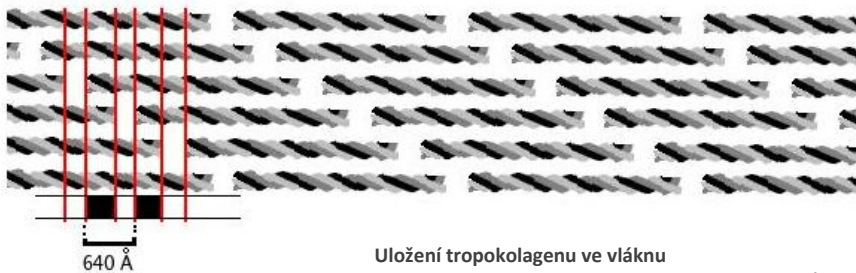


Schématické znázornění prokolagenu - monomer s extendujícími řetězci na C- a N-konci

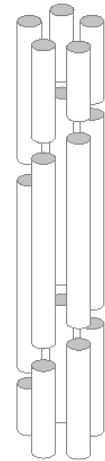
Odštěpené části obsahují *cystin*, který se např. v kolagenu I vůbec nevyskytuje (obsahuje ho ale např. kolagen III z velkých cév, kůže a kloubní tekutiny a kolagen IV z bazální membrány).



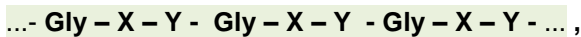
Závěrečným krokem je tvorba *kolagenového vlákna* (kolagenové fibrily): *lyzyloxidáza* působí na lyzylové a hydroxylyzylové zbytky za tvorby aldehydických skupin, které v konečné fázi reagují za tvorby kovalentních vazeb mezi kolagenovými vlákny.



Uložení tropokolagenu ve vláknu
Znázornění (vysvětlení mechanismu vzniku) tmavých a světlých pruhů



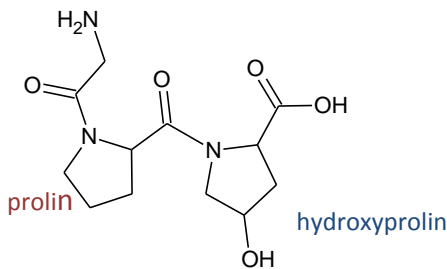
Primární sekvence aminokyselin v α -řetězci kolagenu je



tzn., že *každá třetí* aminokyselina je *glycin*, na pozici **X** je nejčastější aminokyselinou *prolin* (17%) a na pozici **Y** je to *hydroxyprolin*, který, jak již bylo uvedeno, vzniká enzymaticky z prolinu již v peptidovém řetězci (i ještě rostoucím) nebo *hydroxylyzin*, který se tvoří obdobně z lyzinu. Podle typu kolagenu je glykozylován různý počet hydroxylyzinových zbytků, většinou disacharidy.

Model mikrofibrily tvořené pěti tropokolagenovými molekulami

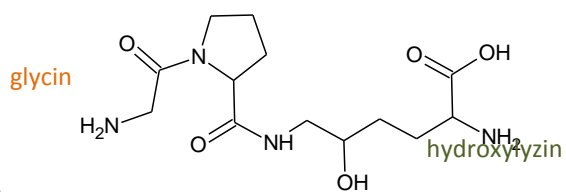
glycin



Ilustrativní znázornění možné kombinace:



prolin



Ilustrativní znázornění možné kombinace:



Syntéza kolagenu I, který se nachází v kostech (v kostech se nenachází žádná jiná forma kolagenu) má některé typické rysy. Např. se tvoří dva typy alfa řetězců, alfa-1 a alfa-2 řetězce. Nazývají se také *preprokolageny*. Obsahují *signální peptid* a na každé straně řetězce ještě *registrační peptid*. Signální peptid je odstraněn v hrubém endoplazmatickém retikulu a řetězce se nyní nazývají *pro-alfa řetězce*.

Za přispění kyseliny askorbové dochází k hydroxylaci popsané výše a vytvoří se šroubovicová struktura (stále v endoplazmatickém retikulu) ze dvou řetězců alfa-1 a jednoho řetězce alfa-2. Takto vytvořený *prokolagen* je transportován do Golgiho aparátu, „nabalíčkován“ a vyloučen exocytózou z osteoblastu. Vně buňky jsou *prokolagenpeptidázou* odstraněny *registrační peptidy* a vytvoří se tak *tropokolagen*.

Tropokolagenové molekuly pak formují kolagenová vlákénka (fibrils), kde lisyloxidáza postupně vytváří příčné spojky mezi hydroxylyzinovými a lyzinovými zbytky (aldolovou reakcí). Příčnými spojkami mezi kolagenovými molekulami jsou u kolagenu typu I (a typu II) pyridinolin a deoxypyridinolin (viz dále v textu). Kolagenová vlákénka se poté formují do kolagenových vláken (*fibers*). Kolagen se může navázat na buněčnou membránu pomocí různých typů proteinů, včetně *fibronektinu* a *integrinu*.

Další bílkoviny obsažené v kostech:

Osteokalcin,

protein vázající vápník, závislý na vitamínu K, nejhojnější nekolagenní kostní bílkovina. Nazývá se také *kostní GLA protein (BGP = Bone GLA Protein)*. Obsahuje 7-karboxylované zbytky kyseliny glutamové (GLA), odtud název. Karboxylace je katalyzována vitamínem K. Osteokalcin je specificky syntetizován v osteoblastech kosti a dentinu. Syntéza je stimulována kalcitriolem (hormon D, 1,25-dihydroxycholekalCIFerol) a vitamínem K. Zvýšená koncentrace osteokalcinu v séru indikuje zvýšený kostní obrát v době nemoci. Viz dále v textu.

Osteonektin, fosfoprotein, který váže jak kolagen, tak kalcium a slouží jako regulátor mineralizace. Nachází se i v krevních destičkách.

Osteopontin, kyselý fosfoprotein vázající kalcium s vysokou afinitou k hydroxylapatitu, mající účast v kostní mineralizaci a dystrofické kalcifikaci (usazování vápníku v abnormálních tkáních jako jsou jizvy či aterosklerotické pláty, při normální hladině vápníku v krvi).

K mineralizaci kostí

jsou potřebné Ca^{2+} a fosfát. Mineralizace je tlumena pyrofosfátem a je pravděpodobně zahájena štěpením pyrofosfátu alkalickou fosfatázou. Role kalcitriolu v řízení hladiny vápenatých iontů a fosfátu je zmíněna u *účinků PTH (podrobnosti v kreditním kurzu: Hormony II)*.

V kosti existuje (za normálních podmínek) rovnováha mezi výstavbou a odbouráním. Nediferencované buňky kostního povrchu mohou být aktivovány (např. prostřednictvím PTH) na osteoklasty, které způsobují odbourání kostí. Kalcitonin nebo estrogeny mohou aktivitu nediferencovaných buněk potlačit a tak dojde k jejich přeměně na osteoblasty, které podporují výstavbu kostí. Osteoblasty obsahují alkalickou fosfatázu (jejíž aktivitu zvyšuje D-hormon), která vytváří vysokou lokální koncentraci fosfátu, což vede (překročením nasycenosti roztoku) k vysrážení Ca^{2+} .

Laboratorní vyšetření u nemocných s kostním onemocněním

Cíle laboratorních biochemických vyšetření u nemocných s kostním onemocněním

- dokumentace celkového stavu pacienta a příspěvek k diferenciální diagnostice
- dokumentace homeostázy vápníku a fosforu (případně hořčíku)
- dokumentace úrovně kostní remodelace

Kostní choroby

Při **osteomalacii** a **rachitidě** je porušena mineralizace základní kostní hmoty, případně základní hmoty růstové chrupavky..

Osteopenii se rozumí úbytek kostní hmoty, **osteoporózou** klinické potíže vznikající následkem uvedeného úbytku skeletu.

Osteoporóza je postupující (progredující) systémové onemocnění kostí, při kterém dochází k úbytku kostní hmoty a poruchám stavby (mikroarchitektury) kostní tkáně. Příčinami jsou nadměrná sekrece kortikoidů,

nedostatek estrogenů (po menopauze), inaktivita (sádrový obvaz, tetraplegie, stav beztlíže). Většinou zůstává příčina neznámá (primární osteoporóza). Důsledkem je zvýšená náchylnost kostí ke zlomeninám. Osteoporózou jsou ohroženy zejména ženy po menopauze.

Základním vyšetřením rizika osteoporózy je **měření denzity (hustoty) kostního minerálu**. Za osteoporózu se považuje snížení obsahu minerálu ve skeletu o více než 2,5 směrodatné odchylky pod průměr u mladých zdravých žen. I když riziko zlomenin je u osteoporózy 5x vyšší než u zdravého jedince, ve skutečnosti jen asi 3% takto ohrožených lidí utrpí zlomeninu. Nemá tedy smyslu léčit (ekonomicky náročně) zbývajících 97% pacientů potenciálně ohrožených na základě měření denzity kostní hmoty. Riziko zlomenin se proto posuzuje *kumulativně z hodnot několika rizikových faktorů*, kde svou roli hrají i některá biochemická vyšetření.

Úbytek kostního minerálu může být způsoben i *jinou chorobou* (Pagetova kostní choroba, osteomalacie, primární hyperparatyreóza, mnohočetný myelom) a příčina úbytku kostní hmoty musí být známa.

Pagetova choroba (syn. m. Paget, osteitis deformans, osteodystrophia deformans) je kostní onemocnění charakterizované poruchou remodelace kosti, při které dochází k nadměrné kostní resorpci následované kompenzatorně zvýšenou novotvorbou strukturálně méněhodnotné kosti. Postihuje buď jednu kost - monostotická forma (15%), anebo kosti více – polyostotická forma, predilekčně axiální skelet: páteř, pánev, femur, sakrum, lebku.)

Predilekční = označení místa, které je nejčastěji určitým chorobným procesem napadáno „choroba má v tomto místě zálibu“.

O osteoporóze a markerech kostního metabolismu viz např. adresu: <http://www.roche-diagnostics.cz/prolekare/osteoporozas.aspx>

Markery kostního metabolismu

Markery kostní remodelace se dělí na

- markery kostní novotvorby
- markery osteoresorpce.

Jsou to

- **produkty degradace kostní matrix** uvolněné při osteoresorpci z organické kostní hmoty (matrix)
- **sérové nebo močové proteiny a enzymy** syntetizované v osteoblastech nebo osteoklastech.

Vyjadřují

- **stupeň kostní resorpce** (osteoresorpce),
- **stopěň kostní novotvorby** a
- **rovnováhu** (spřažení) mezi **oběma procesy**.

Tato rovnováha mezi aktivitou osteoklastů a osteoblastů je v různém stupni porušena

- za různých patologických stavů
- fyziologicky po menopauze a ve stáří.

K diferenciální diagnostice kostních chorob přispívají i některá biochemická vyšetření.

Markery kostní novotvorby	Markery kostní resorpce
Kostní frakce alkalické fosfatázy v séru	Hydroxyprolin v moči
Osteokalcin (kostní GLA protein) v séru	Glykosidy hydroxylysinu v moči
C-terminální propeptid prokolagenu typu I (PICP) v séru	Pyridiniové deriváty v moči
	Pyridinolin (PZD) a deoxypyridinolin (DP)
	Crosslinkové telopeptidy kolagenu typu I C-terminální (ICTP) a N-terminální (INTP)
	C- a N- koncové telopeptidy CTxNTx
	Tartarát-rezistentní kyselá fosfatáza v plazmě

Markery kostní novotvorby

- **Isoenzymy ALP.** mají význam při diferenciální diagnostice hyperfosfatázie, lze prokázat i nádorové ALP. Stanovují se elektroforeticky.
- **Terminální řetězce prokolagenu typu I** (PINP, PICP, extendující řetězce prokolagenu typu I): uplatňují se v diferenciální diagnostice poruch syntézy kolagenu a při monitorování léčby osteoporózy

Test IDS-iSYS intact PINP na stanovení intaktního PINP pro automatické zpracování dodává firma IDS (ImmunoDiagnosticSystems).

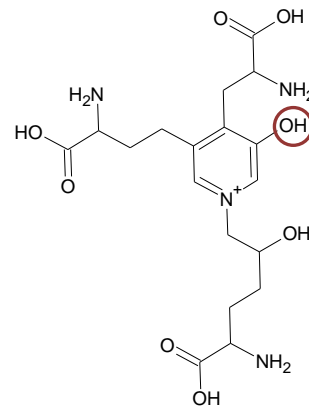
- **Osteokalcin:** je specificky syntetizován v osteoblastech kosti a dentinu. Syntéza je stimulována 1,25-dihydroxycholekalCIFerolem a vitamínem K. Osteokalcin se v krvi, kam částečně přechází jako nezměněný (intaktní) i ve formě fragmentů, poměrně rychle rozkládá (proteolytická degradace) a v oběhu ho zůstává nezměněna asi 1/3, ale i tato část se rychle metabolizuje játry a vylučuje ledvinami, což omezuje jeho diagnostickou hodnotu. Stanovení intaktního osteokalcinu vyžaduje odběr do speciálních zkumavek nebo okamžité zmrazení plazmy po odběru na -70 °C. Toto stanovení má především význam u osteoporózy s deficitem pohlavních hormonů.

Příklad testu pro automatické zpracování: IDS-iSYS N-MID® Osteocalcin

Markery osteoresorpce

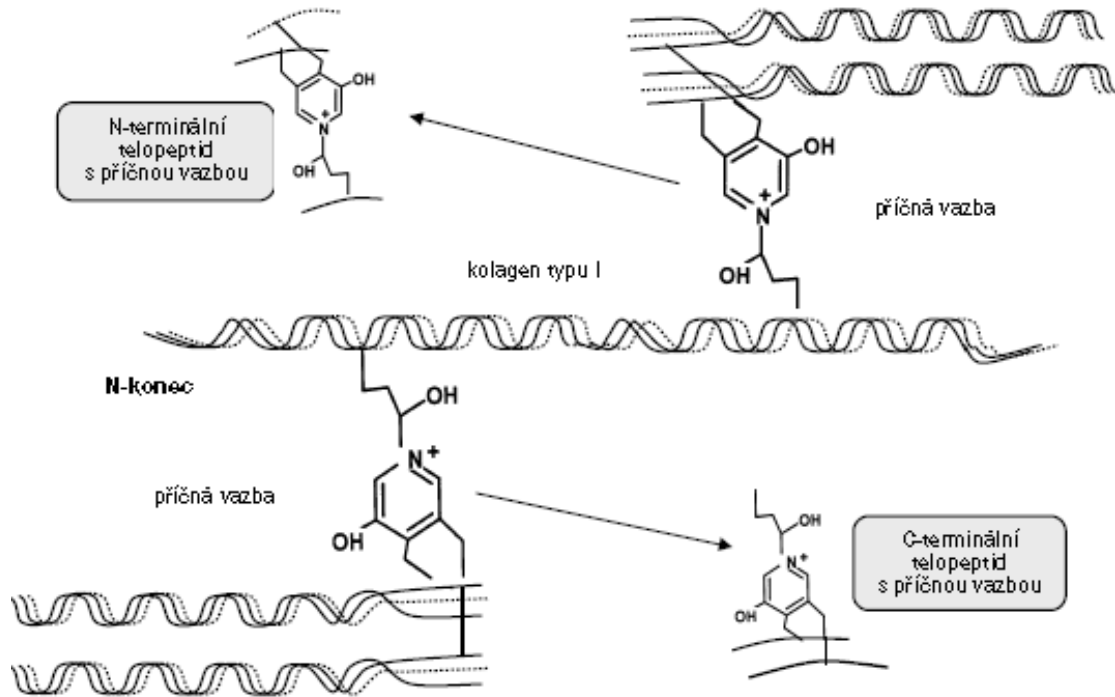
Degradační produkty kolagenu typu I

- **Pyridinolin a deoxypyridinolin v moči** (příčné spojky kolagenu typu I a typu II). Vznikají ve zralém kolagenu intermolekulárním spojením tří lysinových nebo hydroxylyzinových zbytků kolagenních fibril. Pyridinolin (PYD) vzniká spojením tří hydroxylyzinových zbytků, deoxypyridinolin (DPD) spojením dvou hydroxylysinových a jednoho lyzinového zbytku postranního řetězce. V oběhu, kam se dostávají po degradaci kolagenu, se vyskytují jako *volné molekuly* nebo *asociované/vázané v peptidech*, jako tzv. C- a N-koncové pyridinolinové telopeptidy (ICTP). Z krve se dostávají do moči, kde se (PYD a DPD volný či celkový) stanovují metodami HPLC, ELISA, RIA. Asi 1/5 močového deoxypyridolinu pochází z tkání jiných než je kost, nicméně je tato látka v moči považována za poměrně specifický ukazatel osteoresorpce. Pyridinolin a deoxypyridinolin mohou také fungovat jako markery kostních metastáz u pacientů s rakovinou prostaty.
- **C-koncový telopeptid kolagenu typu I, C-Telopeptide** *Pyridinoline Cross-Links, C-koncový pyridinolinový kroslinkový telopeptid kolagenu, C-terminal telopeptide, formálněji carboxy-terminal collagen crosslinks (C-koncové příčné spojky kolagenu; C-terminální kroslinkový telopeptid kolagenu)*. Označuje se ICTP nebo CTX, resp. CTx. Hladina v séru je úměrná osteoklastické aktivitě v době odběru vzorku. U zdravého člověka by měla značně přesahovat hodnoty 300 ng/l, často se nachází v rozmezí 400 – 440 ng/l. Nižší hladiny svědčí o určitém stupni potlačení kostního obratu, kostní remodelace.
- **N-koncový telopeptid kolagenu typu I, neboli N-terminal telopeptide, formálněji amino-terminal collagen crosslinks (N-koncové příčné spojky kolagenu)**, označuje se INTX, případně NTX, resp. NTx. Je to biomarker rychlosti kostního obratu a měří se v moči nebo v séru. Narozdíl od CTx hladiny NTx kolísají ze dne na den, aniž by byl pacient léčen. Hladiny NTx se tedy nedají použít ke zhodnocení efektu léčby. CTx a NTx se stanovují imunoanalyticky nebo metodami HPLC.



Pyridinolin

Trojvázná příčná spojka
(Po odstranění OH- skupiny - v kroužku - dostaneme deoxypyridinolin)

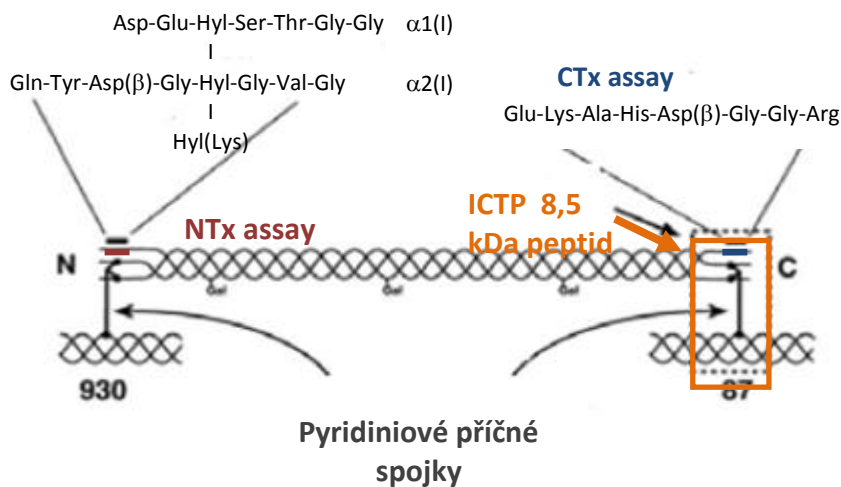


Obrázek je převzat z učebního textu Lenka Fialová, Martin Vejražka, Metabolismu vápníku a fosforu, Praktické cvičení z lékařské biochemie, Všeobecné lékařství, Ústav lékařské biochemie 1. LF UK, 2009/2010

Serum CrossLaps® (CTX-I) je imunochemický test fy IDS (Immuno Diagnostics Systems) pro stanovení CTx, ve formátu ELISA i jako plně automatizovaný test. Je to citlivý a specifický test kostní resorpce. Monoklonální protilátka rozeznává specifickou koncovou sekvenci kolagenu typu I (*Glu-Lys-Ala-His-Asp(β)-Gly-Gly-Arg*), kterou během kostní resorpce odštěpují osteoklasty. Podle α- či β-izomeru kyseliny asparagové (α-se na mění β- při stárnutí kosti, nazývá se tato metoda také α- nebo β-CrossLaps, případně α- či β-CTx. CTx se uvolňuje do krve během kostní přestavby, zvýšená množství indikují zvýšenou kostní resorpci. Poměr hodnot α- a β- vypovídá o rychlosti kostního obratu. Podobné testy mají i jiné firmy.

Video s funkcí automatizovaného systému *ids.isys* je možno shlédnout na adrese: <http://www.idsplc.com/en-ab/dvd/>

Molekulární zdroje markerů kolagenové degradace



Hydroxypyridiniové příčné spojky (crosslinks: PYD, DPD; metody: HPLC, EIA)

Příčně spojené telopeptidy (crosslinked telopeptides):

- **ICTP** (CTX-MMP, C-koncový telopeptid kolagenu typu I; metoda: imunochemie
- **CTx** (lineární oktapeptid z odvozený z C-koncového telopeptidu kolagenu typ I); metoda: ELISA, HPLC
- **NTx** (N-koncový příčně spojený telopeptid kolagenu typu I; metoda): ELISA, HPLC

CTX-MMP: sérový *carboxy-terminal cross-linkde telopeptide of type I collagen generated by matrix metalloproteinases*

- **Osteoklastická kyselá fosfatáza** (tartarát-rezistentní enzym; kostní izoenzym kyselé fosfatázy) se stanovuje fotometricky v plazmě, případně imunoanalyticky v séru. Tento marker vypovídá spíše o množství osteoklastů, nikoli o jejich osteoresorpční aktivitě, přesto ho lze užít jak k hodnocení stupně kostní remodelace, tak k monitorování léčby.
- **Hydroxyprolin v moči.** Při degradaci kolagenu se hydroxyprolin uvolňuje do krevního oběhu a vylučuje se močí, zbývající část je metabolizována játry. Při zvýšené kostní resorpci, např. u osteoporózy, se hladina hydroxyprolinu v moči zvyšuje. Protože se může uvolňovat i jiným způsobem (odbourávání propeptidů kolagenu, ze složek komplementu) nepatří mezi specifické markery osteoresorpce. Navíc je jeho hladina ovlivněna dietou (maso, masové vývary, želatina), proto je nutné dodržovat pokyny pro prepreanalytickou fázi, tj. pacient musí dodržet alespoň jeden den před vyšetřením dietu s vyloučením potravin, které by mohly hladinu hydroxyprolinu ovlivnit

Hodnoty těchto biochemických markerů v séru nebo v moči mohou být ovlivněny

- stupněm kostní remodelace
- tvorbou a uvolňováním obdobných markerů z tkání jiných než kost
- metabolickou clearancí (v játrech, ledvinách, vychytávání markeru v jiných tkáních)
- preanalytickými vlivy (doba odběru materiálu, způsob oddělení séra či plazmy, antikoagulancia, hemolýza, uchovávání vzorku, zmražení)
- analytickými faktory (typ antigenu a použité protilátky, specifita testu, tj. vliv interferujících látek apod.)

Markery kostního metabolismu doplňují densitometrii (měření denzity = hustoty kostní hmoty) a rentgenografii a podle výsledků lze posuzovat dynamiku onemocnění, účinnost terapie a prevence, a to v kratších intervalech než pomocí měření minerální hustoty kosti. Kostní markery pomáhají také identifikovat 10-20% žen, které ztrácejí kostní hmotu rychleji než ostatní.

O klinickém významu vyšetření markerů kostního metabolismu, jejichž nabídka na trhu rychle roste, se v odborných kruzích stále diskutuje. Analytická a interindividuální variabilita výsledků je často příliš vysoká a interpretace vyžaduje značnou zkušenost a orientaci v laboratorní medicíně. Není snad ani nutno dodávat, že stanovení kostních markerů je záležitostí laboratoře s vazbou na specializovanou ambulanci, tudíž, nepatří tato vyšetření mezi běžná, ve smyslu rutinní, vyšetření v rámci běžných oddělení klinické biochemie.

Doporučená laboratorní vyšetření při diferenciální diagnostice osteoporózy

Standardně prováděná vyšetření	Diferenciální diagnostika	Cílená vyšetření
fS-Ca, P _i , ALP, GMT, dU-Ca	Hyperkalcemický a hypokalcemický syndrom, Pagetova kostní choroba	fS-Ca ²⁺ , iPTH, iso-ALP, 25-hydroxycholecalciferol 2-hodinový test: fU-Ca, P _i , renální tubulární práh pro fosfáty
fP-osteokalcin	Hyperkortizolismus	dU-volný kortizol
fS-TSH	Hypertyreóza	fS-T ₃ , T ₄
fS-testosteron (muži)	Hypogonadismus	fS-volný testosteron, LH
fS-ELFO bílkovin	Mnohočetný myelom	diferenciální diagnostika paraproteinémie
<i>iPTH = imunoreaktivní parathormon</i>		

Podle: Prof. MUDr. Jan Štěpán, DrSc., Univerzita Karlova, 1.LF, III. IK, Praha, Osteoporóza, riziko zlomenin a biochemické markery kostní remodelace, Labor Actuell 2044, (Roche,)str. 4-11

O osteoporóze a markerech kostního metabolismu viz např. adresu: <http://www.rocche-diagnostics.cz/prolekare/osteoporoz.aspx>

OBSAH:

Markery	1
1. Nádorové markery	1
Rozdělení nádorových markerů	4
Charakteristika některých vybraných nádorových markerů	8
Formy fPSA	9
Schéma testování PSA	10
2. Markery infarktu myokardu	15
Troponiny	15
Kopeptin	16
3. Markery srdečního selhání	17
Natriuretické peptidy	17
BNP a NT-proBNP	18
DC146	19
3. Markery zánětu	20
Proteiny akutní fáze	21
Pozitivní reaktanty akutní fáze	22
Negativní reaktanty akutní fáze	22
C-reaktivní protein (CRP)	22
Presepsin	23
4. Markery akutního selhání ledvin	24
5. Markery metabolismu kostí	25
Principy metabolismu kostí	25
Laboratorní vyšetření u nemocných s kostním onemocněním	27
Kostní choroby	27
Markery kostního metabolismu	28
Markery kostní novotvorby	29
Markery osteoresorpce	29