

## Kapitola 19 Biomarkery

Na patologické procesy v organismu lze mnohdy usuzovat z přítomnosti látek (v tělních tekutinách) obecně zvaných *markery* či *biomarkery*. Česky bychom asi řekli *ukazatelé*, resp. *bio(logičtí)ukazatelé*, i když známějším českým ekvivalentem anglického *marker* je *značkovač*, případně i *zvýrazňovač* (viz obrázek).

Od biomarkerů očekáváme zejména časnou informaci o stavu, který by při prodlení nejspíše vedl k fatálním koncům. Časná léčba je mnohdy jedinou možností jak dotčným prodloužit život, resp. zlepšit jeho prožívání po ataku choroby či poškození. Jakékoli otálení může být v mnoha případech osudné a zachycení časných známek poruchy normálního stavu se tak stává rozhodujícím.

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.

V podstatě veškeré analyty, které v laboratoři testujeme, se kterými jsem se již setkali, i nesetkali, jsou biomarkery. Některé lepší, jiné horší.



Asi nejobvyklejší představa markeru – značkovače, zvýrazňovače

V této kapitole se zaměříme zejména na typické, případně moderní, nově objevené, markery

- *maligních procesů* (tumorové markery či onkomarkery),
- *postížení myokardu* (ischemie a srdeční nedostatečnosti),
- *patologie kostního metabolismu*,
- *akutního ledvinového selhání*,
- *zánětu a sepse*.

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

### 19.1. Nádorové markery

Nádorové markery je možno definovat jako *laboratorně prokazatelné známky v biologických tekutinách, tkáních nebo buňkách, pomocí kterých je možno prokázat:*

- *riziko vzniku nádoru (tumoru)*,
- *přítomnost nádoru*
- *prognózu vývoje onemocnění*
- *účinnost, neúčinnost či škodlivost terapie*
- *vznik metastáz nebo reziduální choroby nádorového onemocnění*.

Obdobná definice říká, že *nádorovým markerem* se rozumí substance, která se nachází v nádoru, nebo ji nádor produkuje, nebo je produkována jako odpověď hostitele na přítomnost nádoru, a kterou je možno použít k diferenciaci nádoru od normální tkáně, nebo na základě analýzy tělesných tekutin využít k úvaze o přítomnosti nádoru (tumoru) v organismu. Tato substance je měřitelná. Synonymem názvu je *tumorový marker* (TM), případně *onkomarker*.

Jako tumorové markery, klinicky užitečné, mohou sloužit i některé genetické abnormality, jejichž užitečnost tkví zejména ve specifikaci abnormality nádorových buněk, která určí způsob léčby. Může se jednat o přímou detekci mutací v DNA, o stanovení proteinových produktů onkogenů, o zjištění postranlačních modifikací proteinových produktů onkogenů v maligní tkáni i o nově zjištěné genetické změny v maligní buňce, případně o detekci mutací v tumor supresorových genech. Metody zjišťování těchto TM jsou částečně popsány v kapitole 22.

**Onkogeny** jsou geny, jejichž mutace způsobí neřízené dělení buňky a stává se tak základem pro nádorové bujení.

**Tumor supresorové geny (antionkogeny)** jsou geny, které svou činností vzniku tumoru. Jsou zodpovědné za stabilitu genomu a zabráňují replikaci poškozené DNA.

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

Rozlišovací schopnost nádorových markerů umožňuje v příznivých případech odhalit nádor o hmotnosti  $1\text{ mg}$ , tedy asi  $10^6$  maligních buněk, zatímco klinická diagnóza bývá určena většinou až u nádoru, který obsahuje asi  $10^9$  buněk. Hlavní rolí nádorových markerů je *sledování průběhu choroby a účinnosti terapie*.

Snaha o systemizaci tumorových markerů je různorodá tak, jak různorodé jsou samotné markery.

Nejjednodušší dělení je na tumorové markery produkované

- *samotným nádorem*, které se nazývají *antigeny sdružené* či *asociované s nádorem*
- *jinými tkáněmi* (jako odpověď na maligní proces v organismu), což jsou *indukované nádorové markery*, např. *proteiny akutní fáze*.

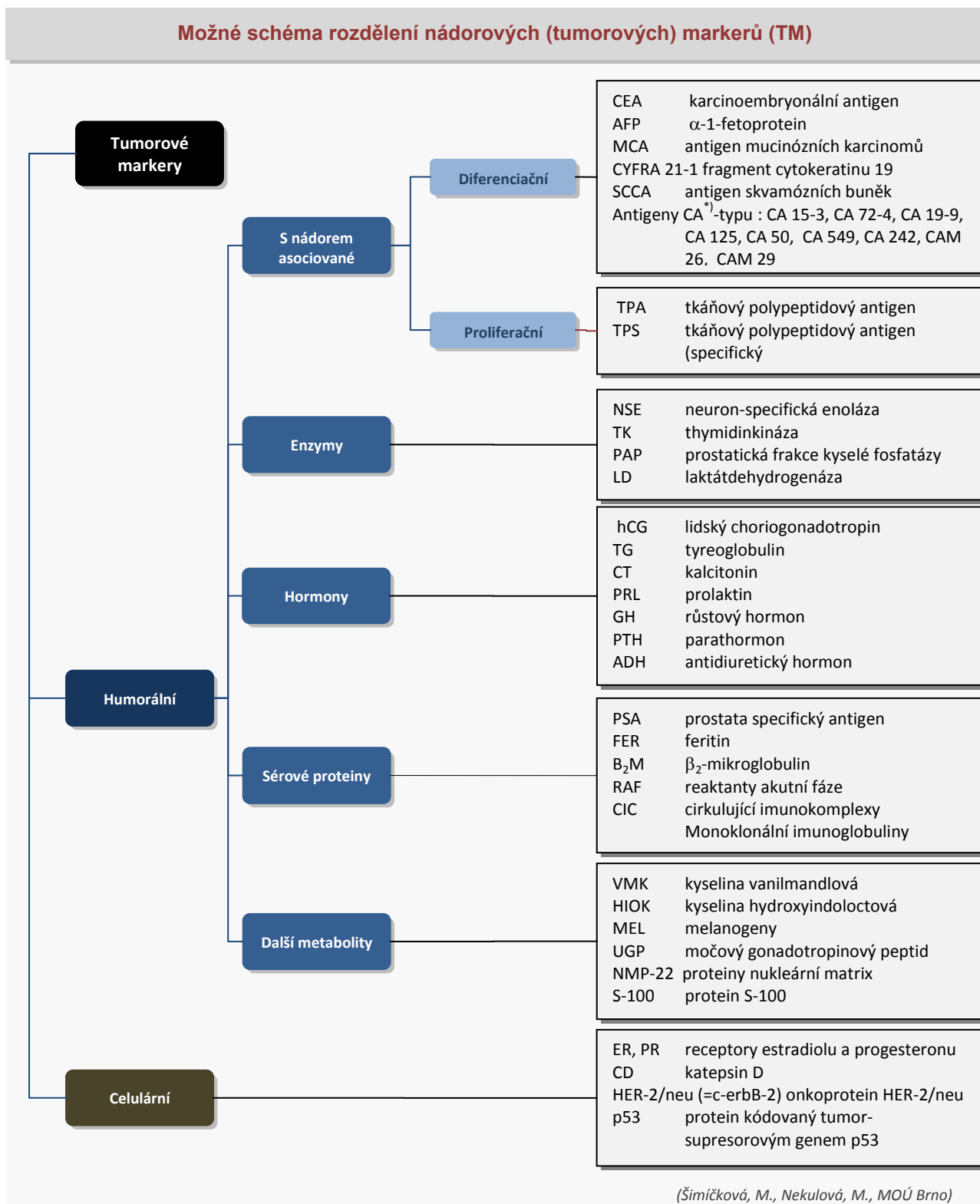
Podle výskytu v organismu lze rozlišit tumorové markery

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

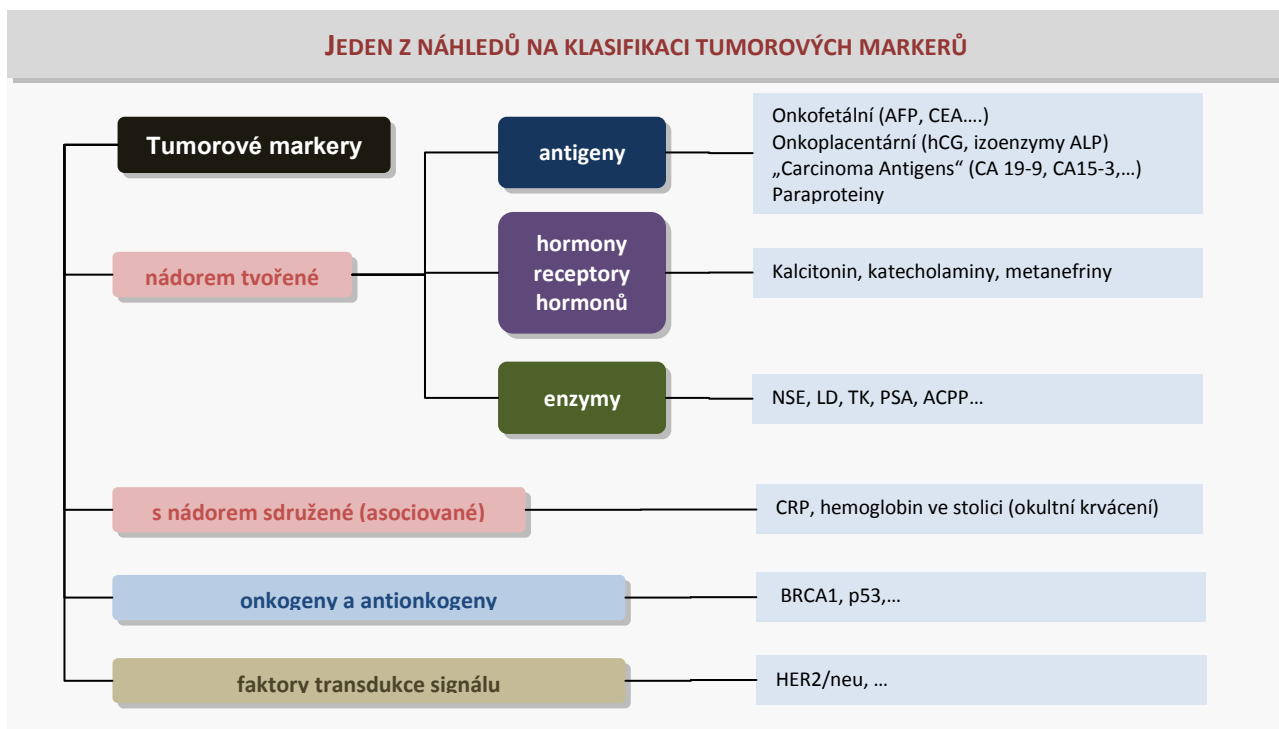
Užitečné je i dělení na tumorové markery

- *diferenciační*, které slouží k rozlišení typu nádoru
- *proliferační*, podle kterých lze usuzovat na aktivitu nádoru.

Tyto principy organizace tumorových markerů jsou využity v následujícím schématu.

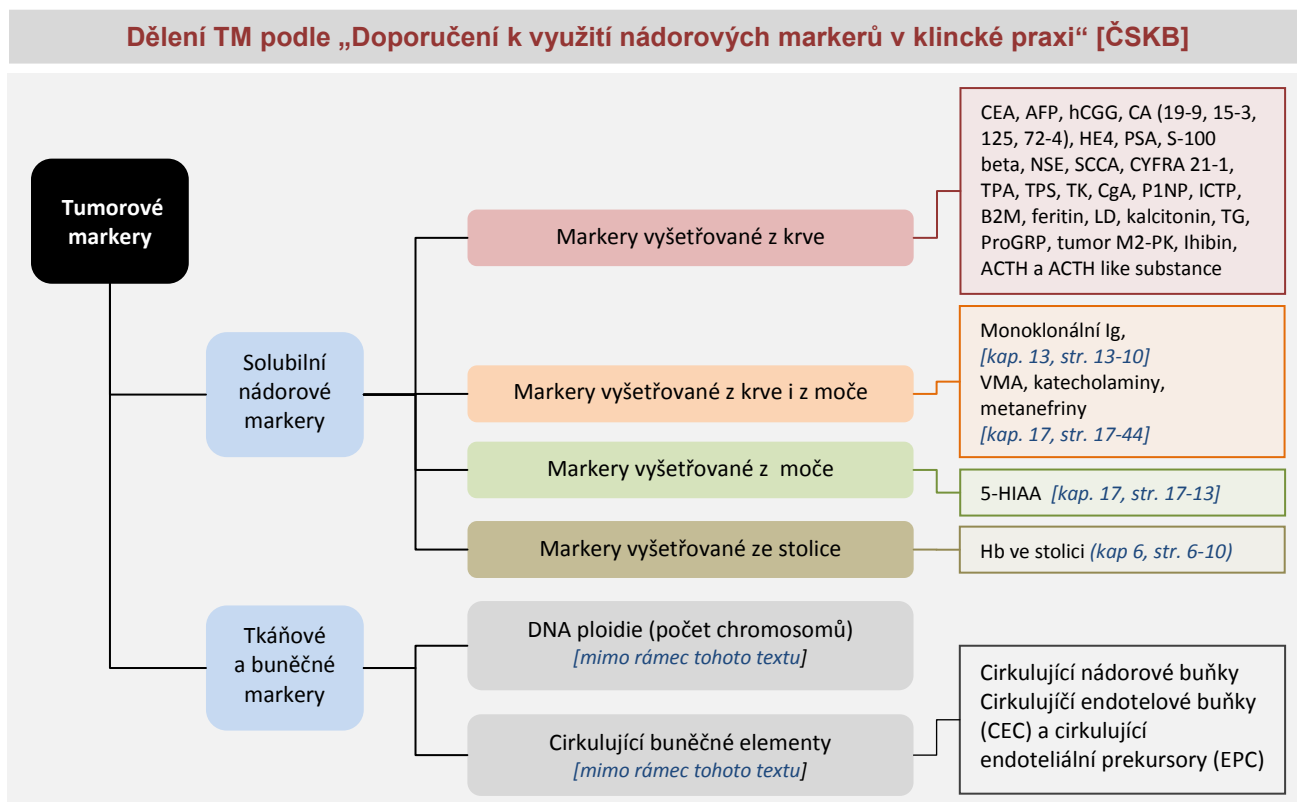


Následující schéma ukazuje přístup nedávno zesnulého prof. Masopusta ke klasifikaci tumorových markerů.



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)

Asi nejužitečnější (i z hlediska laboratorní praxe) bude přidržet se dělení TM podle „Doporučení“ ČSKB, naznačeného v následujícím schématu a opatřeném odkazy na relevantní místa v učebním textu.



**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 Zima, DrSc., Doc. RNDr Petr Štern, CSc., Signální transdukce (část II).

## 19.1.1. Přehled některých tumorových markerů a jejich klinické využití

	Nádor	Nádorové markery	
		Diferenciační	Proliferační
<b>Nádory zažívacího traktu</b>	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	-
<b>Nádory močového ústrojí</b>	Ledvin	NSE, CEA	TPA
	Močového měchýře	CEA	TPA
	Prostaty	PSA, fPSA <sup>*)</sup>	TPS
<b>Nádory varlat</b>	Seminomy	AFP, $\beta$ -hCG, NSE	TK
	Nonseminomy	AFP, $\beta$ -hCG	TPS
<b>Nádory prsu</b>		CEA, CA 15-3	TPS
<b>Gynekologické nádory</b>	Ovárií serózní	CA 125	TPS
	Ovárií mucinózní	CA 72-4, CA 19-9	TPS
	Ovárií germinativní	AFP, $\beta$ -hCG	TPS
	Těla děložního	SCCA, CA 125	TPS
	Ektocervixu	SCCA, CEA	TPS
	Endocervixu	CEA	TPS
	Vejcovodů	CA 125	TPS
<b>Nádory plic a pleury</b>	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
<b>Maligní lymfomy</b>	Hodgkinova choroba	$\beta_2$ -mikroglobulin, ferritin	TK
	Nehodgkinské lymfomy	$\beta_2$ -mikroglobulin	TPS
<b>Hematologické malignity</b>	Plasmocytom	$\beta_2$ -mikroglobulin	-
	Leukémie	$\beta_2$ -mikroglobulin, ferritin	TPS, TK
<b>Nádory CNS</b>	Neuroblastom	NSE	TK

<sup>\*)</sup> 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.] = diferenciací, rozlišující ; **differentiatio** [lat.] = diferenciacie, různost, rozlišování, roztřídění

**proliferatio** [lat.] = proliferace, novotvoření, bujení, chorobný růst (např. tkáně)

**proliferativus** [lat.] = rostoucí, bující, charakterizovaný bujením, proliferativní, proliferační

Zvýšené hladiny tumorových markerů v séru se mohou vyskytovat i u některých *nemaligních* onemocnění, za některých fyziologických stavů či okolností bez vztahu k nádorovému bujení, z čehož jasně vyplývá, že název „tumorové markery“ zcela situaci nevystihuje. Krátký přehled zvýšených hodnot tumorových markerů z různých příčin je uveden v následující tabulce:

NÁDOROVÝ MARKER	NEMALIGNÍ ONEMOCNĚNÍ	JINÁ PŘÍČINA
<b>CEA</b> (karcinoembryonální antigen)	zánětlivé choroby jater jaterní cirhóza pankreatitida	kouření
<b>AFP</b> ( $\alpha$ -fetoprotein)	zánětlivé procesy plic, GIT jaterní cirhóza akutní i chronická hepatitida	těhotenství *)
<b>TPA</b> (tkáňový polypeptidový antigen)	infekční procesy obecně jaterní cirhóza pankreatitida	
<b>CA 15-3</b>	jaterní cirhóza akutní hepatitida postižení ledvinových glomerulů	těhotenství *)
<b>MCA</b> (antigen mucinózních karcinomů)	viz CA 15-3, výraznější	
<b>CA 125</b>	ovariální cysty záněty adnex choroby jater, pankreatu, žlučníku	těhotenství (1. trimestr)
<b>CA 19-9</b>	cirhóza jater cholelitiáza chronická hepatitida akutní a chronická pankreatitida choroby žlučových cest diabetes cystická fibróza	
<b>CA 72-4</b>	benigní mammární nádory	těhotenství *)
<b>PSA</b> (prostata specifický antigen)	benigní hyperplazie prostaty	palpace
<b>hCG</b> (lidský choriogonadotropin)	mola hydatidóza	těhotenství
<b><math>\beta_2</math>-mikroglobulin</b>	postižení ledvin	
<b>TK</b> (thymidinkináza)	interference herpes-viry B <sub>12</sub> deficiencie	
<b>SCCA</b> (antigen skvamózních buněk)	záněty plic poruchy ledvin, jater	
<b>Ferritin</b>	záněty obecně poruchy metabolismu železa	
<b>CYFRA 21-1</b> (CYFRA = cytokreatin fragments; detekce fragmentů cytokeratinu)	choroby urologického traktu myomy, ovariální cysty	

\*) Topolčan, O., Holubec, L., jr., Pecan L., Pikner R., Svobodová S.: Changes in tumor marker values in pregnant women in their II<sup>nd</sup> trimester, Fakultní nemocnice Plzeň

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.

**Metody stanovení a zjišťování (přítomnosti) tumorových markerů odpovídají jejich charakteru.**

Vzhledem k různorodosti povahy nádorových markerů, jsou i metody stanovení (resp. průkazu) různorodé. Používají se metody chemické, imunochemické i metody molekulární biologie. Principy většiny používaných metod jsou popsány v tomto učebním textu (viz např. *ligandové techniky*, kapitola 13, *metody analýzy DNA*, kapitola 22, *kvantitativní stanovení hemoglobinu ve stolici*, kapitola 6 a odkazy ve schématu na str. 19-3) na některé další bude nutno nahlédnout do příslušné literatury (*metody genetiky apod.*).

Vývoj přístrojové techniky (zejména v oblasti imunochemických metod konstrukcí dokonalých automatických analyzátorů) zpřístupnil stanovení mnohých markerů, včetně tumorových, dříve dislokovaných na specializovaná pracoviště i pracovištím klinické biochemie a stanovení tumorových markerů patří dnes mezi běžné, rutinní analýzy. To ovšem nevylučuje nutnost edukace laboratorních pracovníků na všech stupních právě v tomto oboru<sup>\*)</sup>.

<sup>\*)</sup>**Základní edukační pomůckou** může být již citované *Doporučení k využití nádorových markerů v klinické praxi*, uveřejněné na stránkách ČSKB ([viz](#)).

Na pracovištích klinické biochemie se obvykle stanovují solubilní markery ze séra nebo z plazmy (není-li uvedeno jinak, jsou hodnoty pro oba materiály totožné), z moči, případně i z likvoru nebo ze stolice. Vzorky krve většinou vyžadují včasné a důkladné oddělení krevních elementů od séra (plazmy) a zpracování v konkrétním časovém intervalu nebo zamražení biologického vzorku, pokud v tomto časovém intervalu vzorek zpracován nebude.

Je důležité důkladně se seznámit s doporučeními a pokyny výrobce dané diagnostické soupravy pro stanovení markeru a dodržovat je, protože některé faktory v preanalytické fázi mohou významně ovlivnit výsledek analýzy. Kromě dodržení času oddělení krevních elementů a průběhu centrifugace (doba a relativní odstředivá síla), je důležité i použití vhodné odběrové nádobky, zejména nádobky se separačním gelem (některé gely se ukázaly být pro imunochemické analýzy některých analytů nevhodné).

Rovněž je třeba si uvědomit, že v imunochemii se pracuje s koncentracemi analytů o několik řádů nižšími než v běžné biochemické analýze, takže kontaminace vzorku analyzovaném po předcházejícím vysoce pozitivním vzorku může být významná. Analyzátoři tuto záležitost řeší buď dokonalým mytím dávkovačů (patent fy Abbott) nebo používáním jednorázových dávkovacích špiček na dávkovačích (ostatní analyzátoři). Kontaminace ale může přijít v preanalytické fázi i ze strany laborantů, nedodržením zásad správné laboratorní práce.

Ovlivnění výsledku může nastat i v přípravě pacienta, ale to jsou záležitosti podrobně diskutované v kapitole 2, ze značné části věnované preanalytické fázi.



**Advia Centaur XPT System**  
Automatický imunochemický analyzátor firmy Siemens



**LIAISON XL**  
Automatický imunochemický analyzátor  
firmy DiaSorin

Na obrázcích jsou ukázky dvou nových, moderních imunochemických analyzátorů firem DiaSorin a Siemens.



## 19.1.2. Charakteristika některých vybraných nádorových markerů

### 19.1.2.1. 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.

Referenční hodnoty: 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)
- plíc a pleury (epidermoidní, malobuněčné, adeno Ca)

### 19.1.2.2. AFP (alfa<sub>1</sub>-fetoprotein)

Glykoprotein o molekulové hmotnosti přibližně 70 kDa. Obsahuje asi 4,5% sacharidů, patří mezi *onkofetální antigeny*, strukturou je podobný albuminu. Je produkován žlutkovým 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

Referenční hodnoty: 0 - 5 kIU/l

Hraniční hodnoty: 5 - 10 kIU/l

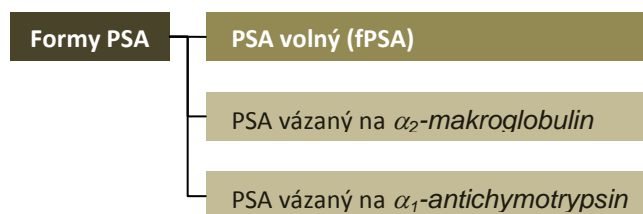
Patologické hodnoty: > 10 kIU/l

**Indikace** – nádory:

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

### 19.1.2.3. PSA, fPSA (prostata 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  $\alpha_2$ -makroglobulin a na  $\alpha_1$ -antichymotrypsin. Volný PSA a komplex s antichymotrypsinem jsou imunologicky detekovatelné.



Volný PSA (fPSA), 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 ztekucení semenné plazmy.

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

Norma hodnot PSA: 0 - 4 µg/l

Hraniční hodnoty: 4 - 10 µg/l

Patologické hodnoty: > 10 µg/l

**Indikace** – nádory prostaty.

**fPSA**

(stanovuje se u hodnot PSA 4 - 10 µg/l; hodnotí se poměr koncentrací fPSA/PSA v %)

Maligní nádor: 0 - 15%

Hraniční hodnoty: 15 - 20%

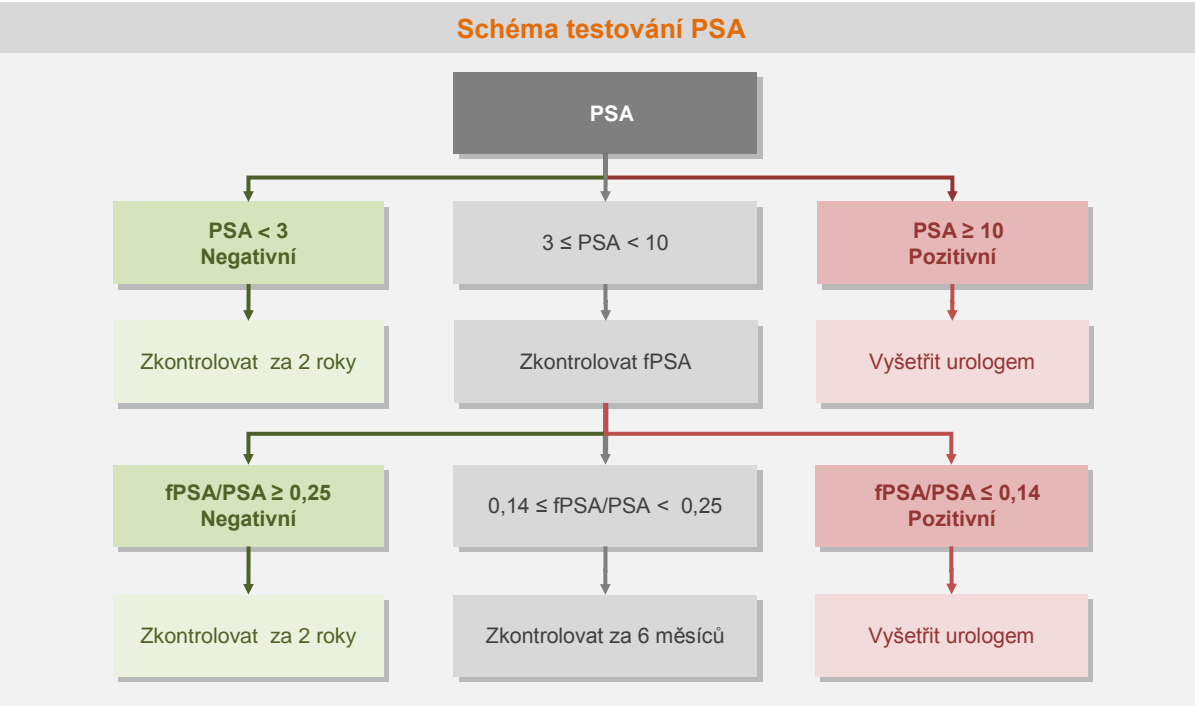
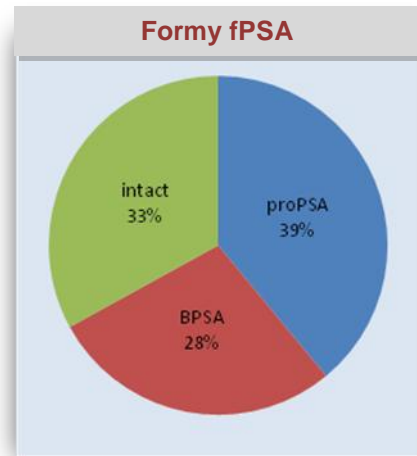
Benigní onemocnění: > 20%

**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 uvedeného schématu.



**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)

**19.1.2.4. hCG** (lidský choriogonadotropní hormon - viz kapitola 14., str. 14-35)

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 specifičtější 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 germinativní)



**19.1.2.5. 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 žlázových 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.

**19.1.2.6. 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 *epiteliálních buňkách dýchacího a trávicího ústrojí, u dospělých v epitheliálních buňkách dýchacího ústrojí, vysoké hodnoty se nacházejí s séru těhotných žen a v mateřském mléce.*

**Fyziologická funkce** - během vývoje plodu funguje jako diferenciací antigen coelomových tkání

[coelom = pravá tělní dutina (vznikající při vývoji mnohých živočichů), obklopená buňkami mezodermálního původu]

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)

**19.1.2.7. 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 epitheliálními 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

**19.1.2.8. CA 72-4**

Monoklonální protilátkou definovaný glykoprotein mucinového typu s molekulovou hmotností okolo 400 kDa. Patří mezi onkofetální nádorové markery. U plodu intenzivně produkují tuto *bílkovinu povrchové epitheliální 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)

**19.1.2.9. SCCA** (antigen skvamózních buněk; SCC antigen)

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)

**19.1.2.10. NSE** (neurospecifická enoláza)

Enzym katalyzující přeměnu 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát (viz *glykolýza* v biochemii). 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)

**19.1.2.11. 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

**19.1.2.12. 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	TPS
Referenční hodnoty:	0 - 120 kIU/l	0 - 85 kIU/l
Hraniční hodnoty:	120 - 140 kIU/l	85 - 95 kIU/l
Patologické hodnoty:	> 140 kIU/l	> 95 kIU/l

**Intermediární (též střední) filamenta** chrání buňky a buněčné membrány před roztržením vyvolaném tahem. Existují tři třídy těchto filament, jednu z nich tvoří *keratinová filamenta* v epiteliálních buňkách. V různých epitelech se nacházejí různé soubory keratinů. Existuje vzácné genetické onemocnění člověka, *epidermolysis bullosa simplex*, které je důsledkem mutací v keratinových genech, následkem je nemožnost tvorby keratinových filament v pokožce. Kůže postiženého člověka není odolná proti mechanickému namáhání, i velmi slabý tlak na kůži způsobuje popraskání buněk a tvorbu puchýřů.

Stavba keratinů je popsána dále v textu na str. 19-?).

**19.1.2.13. 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)

**19.1.2.14. 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. Přítomnost 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 menopauze	
≥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 si můžete vyzkoušet na adrese:

[http://www.abbottdiagnostics.com.au/products/instruments\\_by\\_platform/roma.cfm](http://www.abbottdiagnostics.com.au/products/instruments_by_platform/roma.cfm)

**Z ostatních frekventovanějších TM** je to např. **S-100 beta protein**, popsáný poprvé v nervové tkáni. Vyskytuje se ve formě homo- a heterodimerů tvořených z podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$ . Využívá se při monitorování nemocných s maligním melanomem, zvýšené hodnoty lze nalézt i u mozkových maligních nádorů ektodermálního původu, ale mohou být způsobeny i akutním poškozením mozku, kostními zlomeninami, zánětlivým a infekčním onemocněním. Pro screening a diagnostiku se neuzívá.

Dalším příkladem TM je **CgA (Chromogranin A)**, kyselý glykoprotein z granulí normálních i neoplastických neuroendokrinních tkání. Zvýšené hodnoty se nalézají u nemocných s neuroendokrinními malignitami, u sporadických gastroenteropankreatických neuroendokrinních tumorů i dědičných mnohočetných endokrinních neoplasí typu 1 (MEN), u dětských neuroblastomů, u neuroendokrinní diference karcinomu prostaty nereagující na hormonální léčbu, i v při terapii kortikoidy, poruchách ledvin a jater.

**Endokrinní neoplasie:** Vzácné onemocnění při němž je současně postiženo několik endokrinních žláz. Vyskytuje se sporadicky; většinou jde o hereditární postižení autosomálně dominantního typu. Celá definice (včetně MEN-1, Wernerova syndromu) např. v [Medicabáze.cz](#)

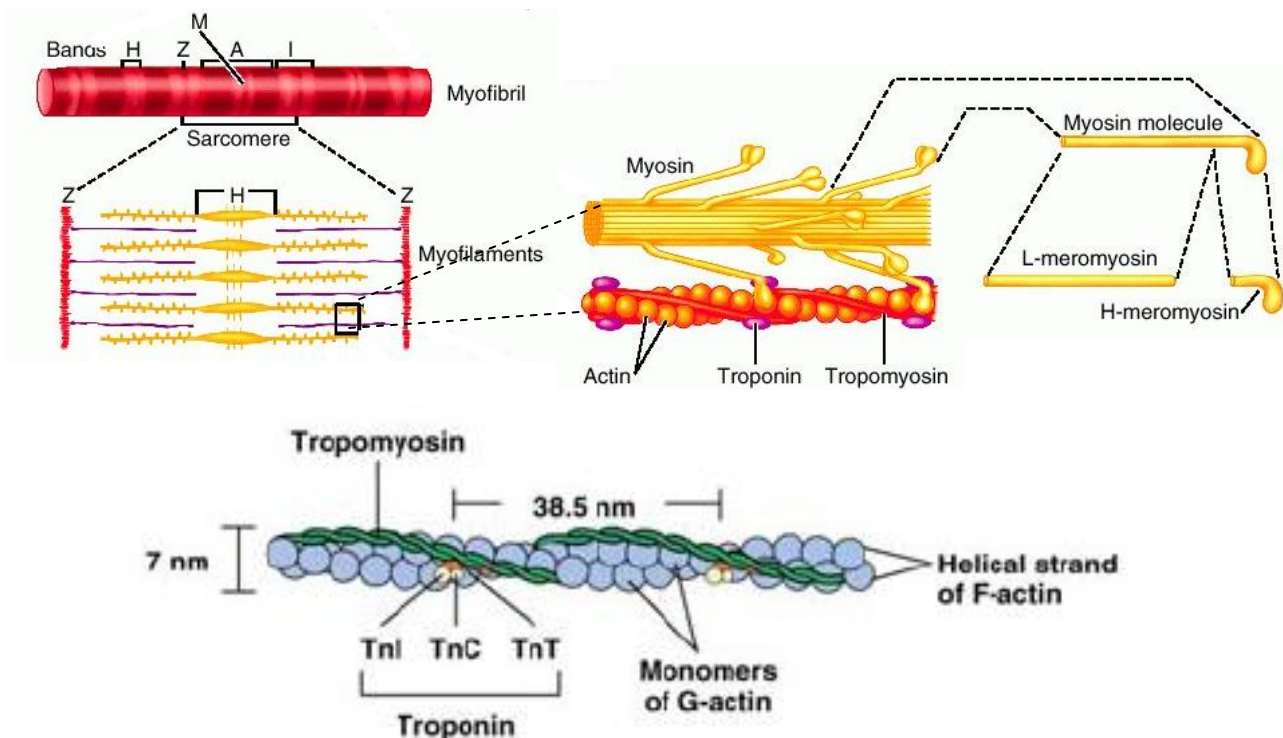
## 19.2. Markery postižení myokardu

V této podkapitole se zaměříme na dvě závažné okolnosti omezující, či znemožňující srdeční činnost: ischemii, která může vyústit až v infarkt myokardu a srdeční selhání.

### 19.2.1. Troponiny

**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) považovány *bílkoviny troponinového komplexu*. Nespecifický *myoglobin*, *CK-MB/CK-MB mass* a *LD* se již považují za obsolentní. V současné době existuje tzv. *Třetí univerzální definice infarktu myokardu*, v české verzi možno nalézt např. [zde](#).

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



Na obrázcích je znázorněna vazba aktinu, troponinu a tropomyosinu s myosinem v myofibrile (žlutočervený obrázek nahoře) a vlastní podrobněji popsany troponinový komplex (na spodním modrozeleném obrázku).

*helical* = spirálový, šroubovitý; *strand* = vlákno, šňůra, větev

**Troponiny** z kosterního svalstva a ze srdečního svalu lze rozlišit *imunochemicky*. V praxi se stanovují kardiální *troponin T (cTnT)* a kardiální *troponin I (cTnI)*. Pro troponiny je typické, že ve zdravém organismu se nevyskytují v séru ve zvýšených hodnotách. 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 myokardu). 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, čili kromě nekrózy kardiocytů, se na zvýšení hladiny Tn podílejí jevy jako apoptóza, zvýšení permeability buněčné membrány, aktivní sekrece partikulí troponinu aj., a tyto skutečnosti je třeba mít na paměti při interpretaci výsledků, kterou by měl lékař provádět vždy s ohledem na klinický stav pacienta.

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 nejděle 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, Vista, Centaur aj. 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 jako (jedinou) *diskriminační hodnotu* hodnotu 99. percentilu referenční populace, s precizností stanovení  $VK\% \leq 10$ . 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 včasnejším průkazu nekrózy myokardu, v příspěvku 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 morbidit a mortality). Praxe mimo jiné ukázala, že je třeba používat 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. Z původně předpokládaného „zlatého standardu“ pro diagnostiku AIM se stal biomarker obecně pro ischemii srdečního svalu, včetně IM.

**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>

### 19.2.2. Kopeptin

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



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.*

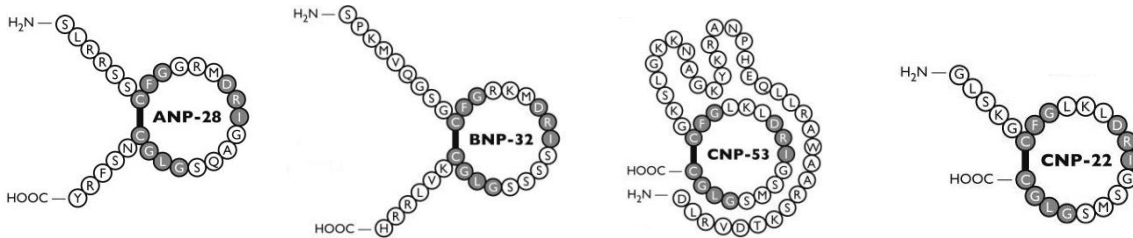
**Poznámka:** Potřebné reagentie vyrábí pro imunochemické stanovení na analyzátoru Kryptor fa BRAHMS a na českém trhu dodává fa Lacomed s.r.o.; ELISA soupravy vyrábí např. fa Usca Life Science Inc.



### 19.2.3. Natriuretické peptidy

**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.

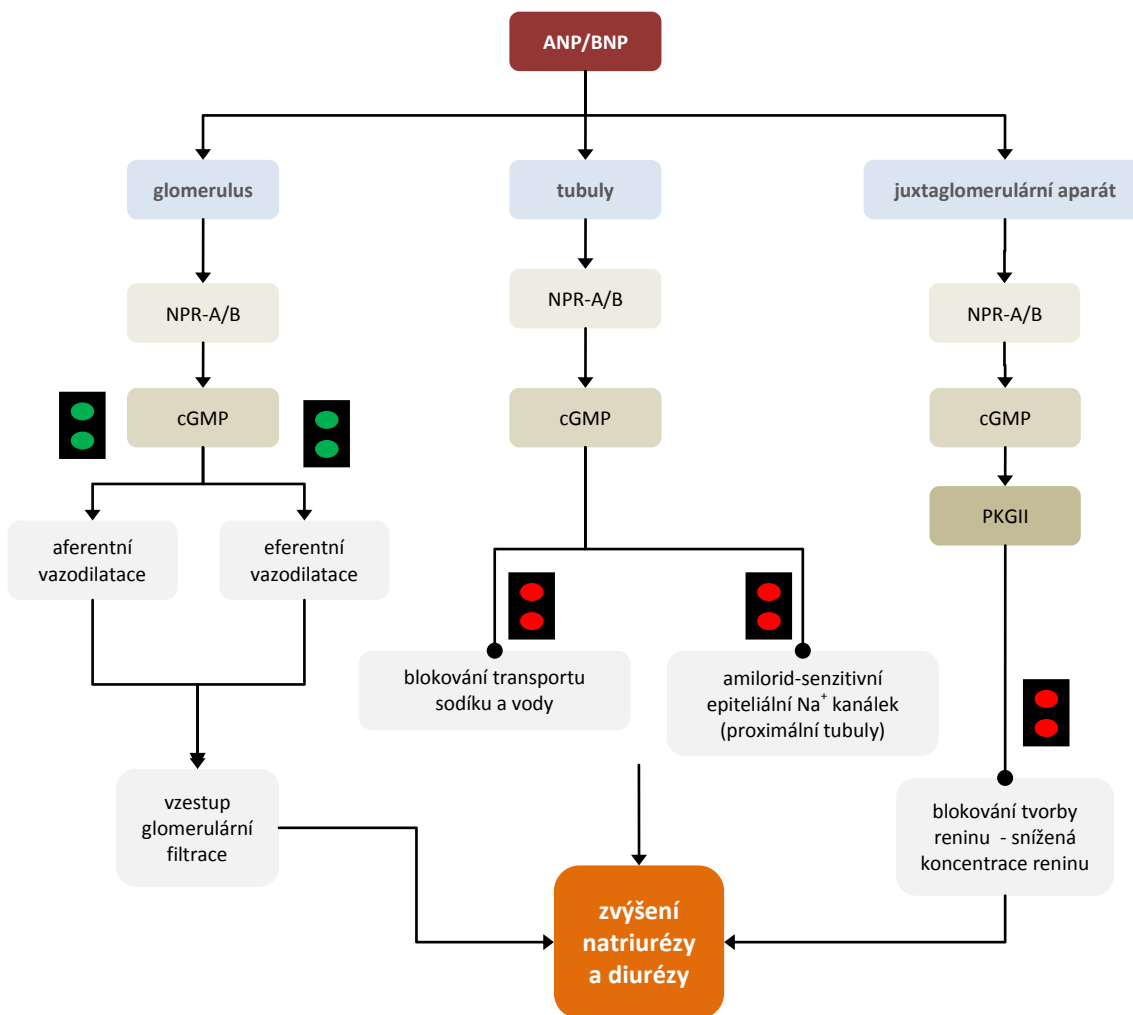
Natriuretické peptidy tvoří „rodinu“ hormonálně aktivních látek, které jsou tvořeny 17členným kruhem spojeným disulfidickým můstkem a postranními řetězci, jejichž počet a délka se různí u jednotlivých zástupců. Do této rodiny se počítají i prekuzory a deriváty, které mohou mít význam buď jako hormony, nebo mají význam diagnostický, případně obojí. Známy 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. Ovlivňují srdeční tkáň, hormonální systém, imunitní systém a mají i další účinky.



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

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. Antonín Jabor, CSc., Natriuretické peptidy, Roche s.r.o., Diagnostics Division, Praha, 2010; ISBN 978-80-254-7929-2, str.69-70

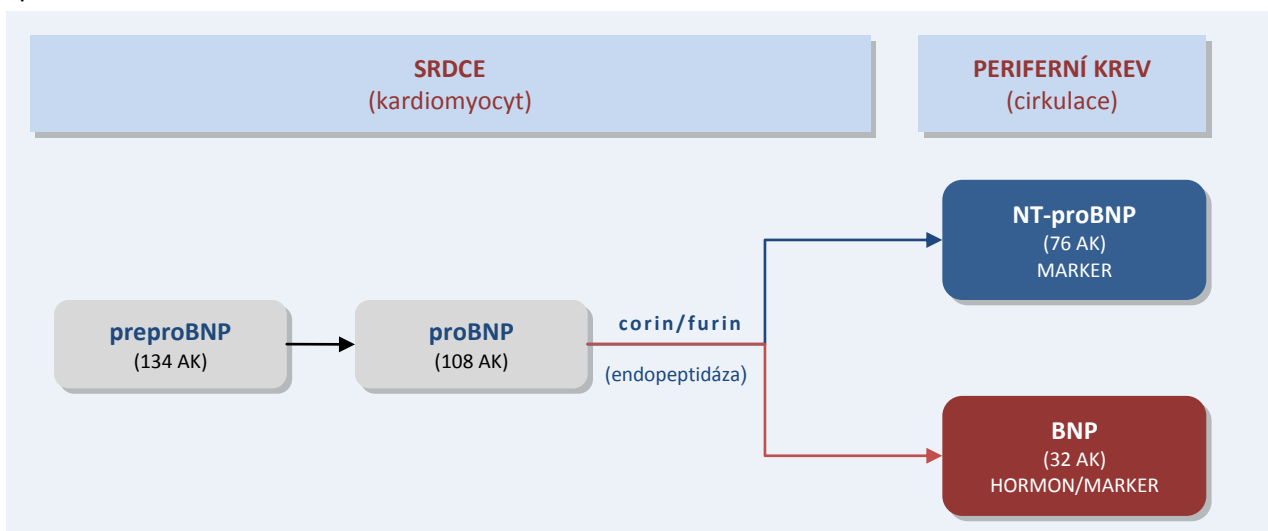


Natriuretické peptidy působí prostřednictvím receptorů v ledvinách, cévách, mozku a dalších orgánech. V ledvinách ovlivňují vazodilataci a vazokonstrikci působením na svalové buňky *vas afferens* resp. *vas efferens*, relaxaci a zvýšení filtrace prostřednictvím *mesangiálních* buněk, působí také na buňky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

#### 19.2.4. 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 resorpci (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*).

Hodnoty BNP v ng/l	Diagnóza
<100	srdeční selhání nepravděpodobné
>100	chronické srdeční selhání
>500	akutní srdeční selhání
>800	srdeční selhání 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.

**Metodami stanovení pro BNP i NT-proBNP jsou ligandové techniky** (např. soupravy ABBOTT pro stanovení BNP na analyzátořech řady Architect, soupravy firmy Roche pro stanovení NT-proBNP na analyzátořech Elecsys, Cobas a jiné).

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>

**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.

**Perspektivními biomarkery akutního srdečního selhání** se zdají být i *galectin-3*, malý peptid (cca 30kDa) z rodiny lektinů, *proadrenomedulin*, vazoprezorický peptid s hormonálními účinky syntetizovaný řadou tkání a *ST-2*, protein z receptorové rodiny interleukinu-1.

### 19.3. Markery zánětu

[inflammatio (l), flogósis (ř) – zánět]

Každý organismus si chrání svoji celistvost, svou integritu. Při poškození odpovídá organismus *zánětem* což je, řečeno ústy imunologa<sup>1</sup>,

„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 rakovinou, 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
- tep 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*.

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

V zánětové 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. Nerovnováha těchto dějů vede k neblahým důsledkům:

- **Nadměrná zánětová odpověď (hyperkativní 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 protizánětová odpověď (syndrom kompenzační protizánětové 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 množením mikroorganismů, průnik patogenů z intestinálního traktu a rozvoj sepse, septického šoku a posléze selhání orgánů.
- **Dynamická rovnováha mezi SIRS a CARS** procesy vyúsťuje ve stav zvaný **syndrom smíšené antagonisticke odpovědi (MARS, Mixed Antagonistic Response Syndrom)**, kdy výsledným obrazem je kombinace syndromů SIRS a CARS s různými projevy obou těchto komponent (SIRS + CARS = MARS).

SIRS i septický SIRS (seps), mohou vést (mechanismy popsány výše) k selhání životně důležitých orgánů, tj. k rozvoji **syndromu multiorgánové dysfunkce (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 je časté onemocnění léčené na JIP, s nákladnou léčbou. 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.

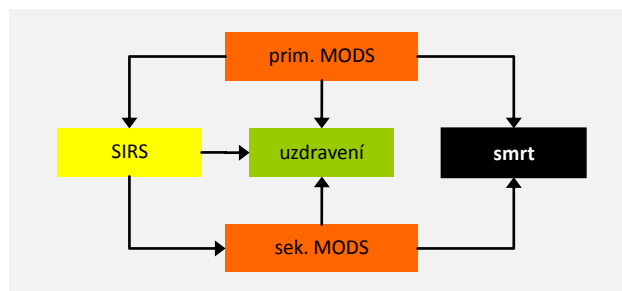
Jak vidno, zánět je sice nejvýznamnější obranou, ale také sebepoškozující reakcí organismu.

Nekontrolovaná, či špatně kontrolovaná zánětlivá odpověď může vést nakonec ke smrti.

Včasná a správná diagnostika SIRS a včasné zachycení sepse, 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 spoustě 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**.



### 19.3.1. 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 kortikoliberinu, adrenokortikotropního hormonu, vazopresinu, produkce stresových hormonů - katecholaminů, kortizolu, pokles trijódtyroninu a tyroxinu, aj.)
- **změny v hematopoeze** (anemie, 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%, nárůst nebo pokles.) 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- $\alpha$ ). V akutní fázi zánětu se uplatňují zejména IL-6 (nejvýznamnější stimul pro většinu proteinů akutní fáze), IL-1b, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  a IL-8. Rozlišují se *pozitivní a negativní reaktanty* akutní fáze.

### 19.3.1.1. Pozitivní reaktanty akutní fáze

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

Patří sem

- *inhibitory proteáz* ( $\alpha_1$ -inhibitor proteáz,  $\alpha_2$ -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).

### 19.3.1.2. 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)**, 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, bakteriálních infekcí, infarktů, malignit, cholestázy, hypotyreózy a
- *sníženy* např. u Wilsonovy choroby, nefrotického syndromu a malnutrice.

Mírně zvýšené hodnoty indikují přítomnost chronického zánětu.

CRP je popsán také v kapitole 13 Bílkoviny na str. 13-9, kde je možno shlédnout i obrázek molekuly CRP.

### Referenční hodnoty (přesněji: *cut off*) CRP: $\leq 3$ mg/l

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

Sledování nízkých (mírně přesahujících *cut off* 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.11-28).

**Prokalcitonin (PCT)** – 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:

$< 0,5$   $\mu$ g/l       $\geq 0,5$   $\mu$ g/l       $\geq 2$   $\mu$ g/l       $\geq 10$   $\mu$ g/l

jejichž interpretace je v následující tabulce na str. 19-19.





Pacienti	PCT (µg/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)



PATHFAST  
imunochemický minianalyzátor

**Presepsin** (solubilní CD14 subtyp, sCD14-ST; CD = cluster of differentiation) 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.

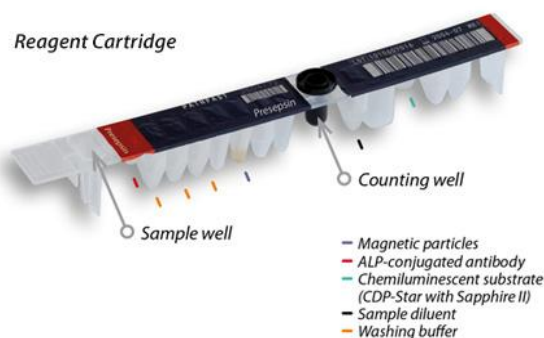
Z prvních srovnávacích měření se jeví, že presepsin reaguje citlivěji na sepsi než PCT a mohl by být použit pro časnou diagnostiku sepse, její prognózu a ke sledování průběhu onemocnění a odpovědi na léčbu. Protilátka proti presepsinu je základem pro imunochemického stanovení, které nabízí v ČR fa Medesa, pod názvem PATHFAST Presepsin.

(Podrobnosti: <http://www.procalcitonin.com/default.aspx?tree= 2 2&key=aboutpct1>; kvantitativní stanovení na analyzátoru miniVidas viz na adrese: [http://www.asclsmn.org/uploads/6\\_nancy\\_migliano\\_color.pdf](http://www.asclsmn.org/uploads/6_nancy_migliano_color.pdf))

**Diskriminační hodnota** pro rozlišení zdravých a nemocných se sepsi 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 časnou diagnostiku nástupu zánětlivého procesu (např. neonatální sepse).



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

**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 sepsi, 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 diferenciální diagnostice zánětů včetně bakteriálních.

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

## 19.4. 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.

### 19.4.1. Kritéria pro hodnocení poškození funkce ledvin

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

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

- Risk, riziko (poškození)
- Injury, poškození
- Failure, selhání
- Loss, ztráta (funkce)
- ESRD, End Stage Renal Disease, konečné stadium ledvinového onemocnění .

Základními laboratorními charakteristikami definujícími stadia poškození ledvin jsou hodnoty sérového kreatininu a diuréza, jinými slovy, 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 poškození jater)
- přímé poškození renálního parenchymu (glomerulonefritidy, hemolyticko-uremický syndrom, *HUS*)
- 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 jevil nový marker z rodiny *lipokalinů*, malých sekrečních proteinů, účastnících se převážně transmembránových přenosů lipofilních substancí, **neutrofilní lipokalin asociovaný s gelatinasou/želatinázou (NGAL)**, součást antioxidantního ochranného systému ledviny, jehož hladina v moči i v plazmě se oproti hladině S-kreatininu v případě hrozícího AKI zvyšuje podstatně rychleji, řádově v hodinách. Současné zkušenosti v klinické praxi jsou prozatím poněkud rozpačité, pro použití NGAL v diagnostice AKI existuje řada argumentů pro i proti. Nicméně existuje silná skupina expertů toto použití obhajujících. Navíc se objevily nové možnosti použití NGAL jako biomarkeru v dalších oblastech: *sepsy, nemoci myokardu, kardiorenální syndrom, transplantace, systémová onemocnění* a další. Jako první začala dodávat komerční vazebný test firma Abbott pro své systémy Architect.



NGAL  
model molekuly

**Albumin** možná hraje v ledvině ochrannou roli, o čemž svědčí jeho zvýšená syntéza u AKI a jeho výpovědní hodnota u experimentální AKI byla podobná jako vykazoval NGAL. Možnost využití albuminu v této souvislosti se diskutuje.

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 ([viz](#)). 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 poškození a selhání ledvin: nové biomarkery v časně diagnostice, Postgraduální medicína, 2010, 12, č. 9



## 19.5. 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.  $\text{Ca}^{2+}$ , fosfát, ve formě hydroxylapatitu ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) a uhličitany ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{Na}^+$ ), které dávají kosti pevnost (*srovnej s textem a obrázkem na str. 11-1*).

*Κολαγενο, colagené* (ř.) = klišodárný

### 19.5.1. Kolagen a další bílkoviny obsažené v kostech

**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.

V době psaní textu bylo 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 površích 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 stácejí podobně jako lano a vytvářejí tyčinkovitou strukturu, molekulu kolagenu. Každá polypeptidová podjednotka ( $\alpha$ -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.

#### Syntéza kolagenu obecně vychází z prokolagenu.

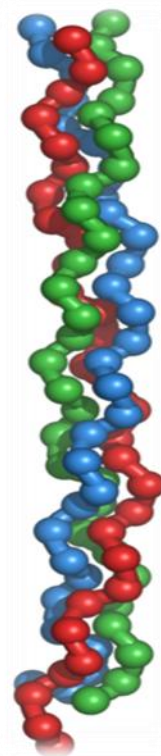
První částí nového peptidového řetězce je *vedoucí* či *signální sekvence* na *N-terminálním* konci, která zodpovídá za nasměrování vytvořeného *pre-pro-peptidu* (*pre-pro-kolagenu*) do endoplazmatického retikula, kde dochází k postranslačním změnám a tvoří se  $\alpha$ -peptid: signální peptid na *N-terminálním* konci je odstraněn a vzniklá molekula se nazývá *propeptid* (nikoliv *prokolagen*).

*Prolylhydroxyláza* a *lyzylhydroxyláza* hydroxylyjí prolin a lyzin za vzniku hydroxyprolinu a hydroxylyzinu, což dále umožňuje stočení řetězců a tvorbu příčných vazeb (*cross-links*) mezi  $\alpha$ -peptidy. Při těchto enzymatických reakcích je vyžadována přítomnost vitamínu C (kyseliny askorbové) jako kofaktoru. Pokud by k hydroxylacím nedošlo, nevytvořila by se trojitá šroubovice.

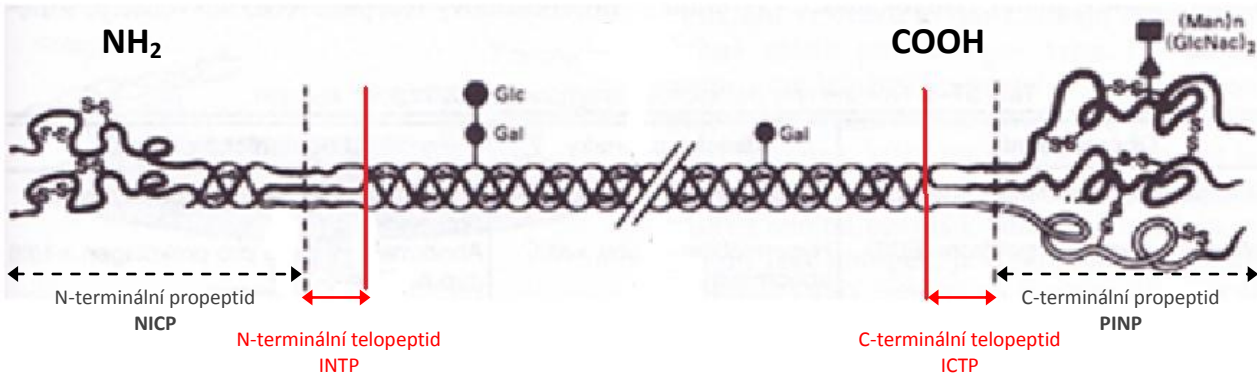
Dalším krokem je vazba (glykosylace) glukosových nebo galaktosových monomerů na hydroxylovou skupinu lyzinu. Poté dojde ke stočení tří (hydroxylovaných a glykosylovaných) peptidů do těsně utažené trojšroubovice, která má jak na *N-konci*, tak na *C-konci* volné části řetězců, tzv. *extendující* (*extenzní*) 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 (prokolagen-I-C-terminální propeptid, P1CP a prokolagen-I-N-terminální propeptid, PINP)** a zůstane střední část, tj. *kolagenová molekula*, která se také nazývá *monomer kolagenu* nebo starším názvem též *tropokolagen*.

Na následující straně jsou základní kroky syntézy kolagenu a tvorby kolagenových vláken znázorněny na schématech. Současně je naznačeno i štěpení kolagenu působením kolagenáz při jeho degradaci.

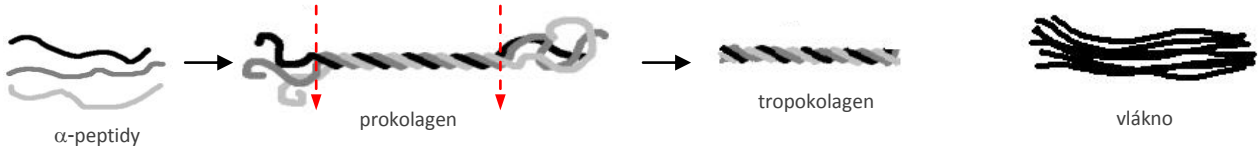


Spirálové vlákno kolagenu



**Prokolagen - monomer s extenzujícími řetězci na N- a C-konci a místa odštěpení terminálních propeptidů (čárkovaně). Červeně jsou označena místa štěpení při degradaci kolagenu kolagenázami a vznik terminálních telopeptidů (viz dále v textu).**

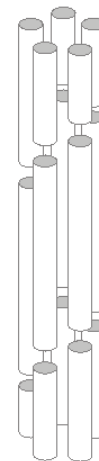
Odštěpené části obsahují *cystin*, který se např. v kolagenu I vůbec nevyskytuje (obsahují ho ale např. kolagen III z velkých cév, kůže a kloubní tekutiny a kolagen IV z bazální membrány).



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**  
Znárodnění (vysvětlení mechanismu vzniku) tmavých a světlých pruhů

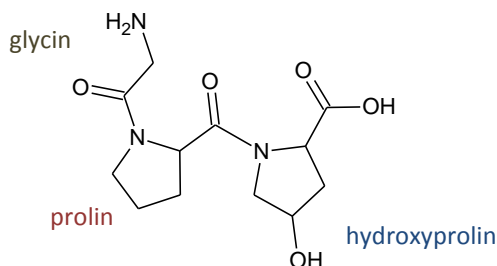


Primární sekvence aminokyselin v  $\alpha$ -řetězci kolagenu je

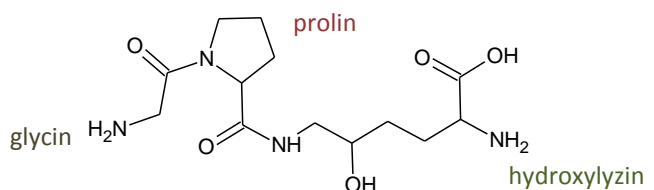


**Model mikrofibrily tvořené pěti tropokolagenovými molekulami**

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.



**Ilustrativní znázornění možné kombinace:**  
Pavel Nezbeda **Gly - X - Y = Gly - Pro - Hyp**



**Ilustrativní znázornění možné kombinace:**  
19-22 **Gly - X - Y = Gly - Pro - Hyl**

**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 lisyoxidáza 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*.

### **Degradace kolagenu se zúčastňují**

- **katepsin K** (proteáza, nejsilnější savčí kolagenáza), kdy dochází k odštěpení C-koncového telopeptidu, tzv. CTx
- **matrixové metaloprote(in)ázy** (tzv. *MMPs*), na zinku závislé endopeptidázy. Tyto *kolagenázy* štěpí kolagen za uvolnění C- a N- koncových telopeptidů ICTP a INTP.

### **Další bílkoviny obsažené v kostech:**

#### **Osteokalcin**

Osteokalcin je 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-dihydroxycholecalciferol) a vitamínem K. Zvýšená koncentrace osteokalcinu v séru indikuje zvýšený kostní obrát v době nemoci. Viz dále v textu.

#### **Osteonektin**

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

#### **Osteopontin**

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).

### **Přestavba (remodelace) kostí probíhá po celý život**

Závisí na ní schopnost kosti přizpůsobit se proměnám svého zatížení, zachovává celistvost kosti a spolupodílí se na metabolismu  $\text{Ca}^{2+}$  a fosforečnanů. Vrcholu kostní hmoty dosáhne člověk ve svých 25 letech, poté asi pět let probíhá tzv. *vyrovnaná remodelace* (tvorba a odbourání kosti jsou v rovnováze) a nakonec dochází k *trvalému úbytku* kostní hmoty (cca 0,5%/rok), kdy odbourání převyšuje kostní novotvorbu..

Na remodelaci kostí se podílí celá řada vlivů. Jedním z hlavních regulujících mechanismů přestavby kostí je její zatížení (např. obézní lidé trpí méně významným úbytkem kostní hmoty, protože jejich kosti jsou trvale více zatěžovány). Remodelaci kosti ovlivňují hladiny vápníku a fosfátů. Nediferencované buňky kostního povrchu mohou být aktivovány (např. prostřednictvím PTH) na osteoklasty, které způsobují odbourání kostí. Kalcitonin nebo estrogény mohou aktivitu nediferencovaných buněk potlačit a tak dojde k jejich přeměně na osteoblasty, které podporují výstavbu kostí (u žen po menopauze, kdy je snížena tvorba estrogenů, je úbytek kostní tkáně urychlen, hrozí riziko rozvoje *osteoporózy*). Osteoblasty obsahují alkalickou fosfatázu (jejíž aktivitu zvyšuje D-hormon), která vytváří vysokou lokální koncentraci fosfátu, což vede (překročením nasycenosti roztoku) k vysrážení  $\text{Ca}^{2+}$ . Osteoklasty jsou stimulovány hormony štítné žlázy (podpora degradace), glukokortikoidy inhibují proteosyntézu v osteoblastech a jejich diferenciaci, tudíž snižují novotvorbu kostí, inzulin zvyšuje syntetickou aktivitu osteoblastů (možné ztráty kostní hmoty při neléčeném diabetu), růstový hormon stimuluje kostní tvorbu prostřednictvím lokálních růstových faktorů (somatomediny IGF-1 a IGF-2; viz též kapitola 17, str. 17-12.).

## 19.5.2. Kostní choroby

Nejdůležitějšími onemocněními kostí jsou *osteoporóza*, *osteomalacie* a *rachitida*.

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

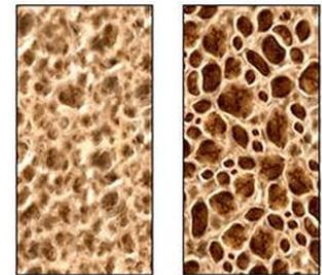
### Pro zvědavé studenty:

*Osteopenii* se rozumí úbytek kostní masy, její prořidnutí, doslova její chudost [*osteon*, ř., = kost; *penia*, ř. = chudost]. Někdy užíváno (nepřesně) místo *osteoporóza*. Je-li hodnota tzv. T-skóre při densitometrii v intervalu -1,0 až -2,5 jedná se o osteopenii. Při osteoporóze je hodnota T-skóre <-2,5. Může jít o stav předcházející osteoporóze, její nižší stupeň, ale i o projev stárnutí ([viz Velký lékařský slovník on-line](#)).

*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.

*Osteoporóza* [*osteon*, ř., = kost; *poros*, ř., = průchod], prořidnutí kostí, úbytek kostní tkáně, postihující relativně rovnoměrně organickou i minerální kostní strukturu.

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.



Normální kost

Kost s osteoporózou

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 kostí 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/osteoporoz.aspx>

## 19.5.3. 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

#### 19.5.3.1. 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),
- *stupeň 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- a N- terminální propeptid prokolagenu typu I (PICP, resp. PINP) v séru	Volný a celkový pyridinolin (fPYD, tPYD) Volný a celkový deoxypyridinolin (fDPD, tDPD) Crosslinkové (kroslinkové) telopeptidy kolagenu typu I C-terminální (ICTP uvolněný MMPs) a N-terminální (INTP) C-koncový telopeptid CTx (uvolněný katepsinem K)
	Tartarát-rezistentní kyselá fosfatáza v plazmě (TRACP5b)

## 19.5.3.1.1. Markery kostní novotvorby

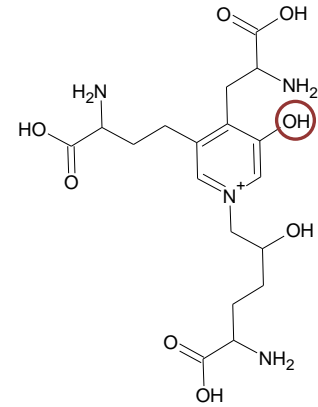
- *Isoenzymy ALP (izoforma 3. izoenzymu, kap. 12, str. 12-19)*: mají význam při diferenciální diagnostice hyperfosfatázie, lze prokázat i nádorové ALP. Stanovují se elektroforeticky.
- *Terminální řetězce prokolagenu typu I* (PINP, PICP, extendující řetězce prokolagenu typu I): uplatňují se v diferenciální diagnostice poruch syntézy kolagenu a při monitorování léčby osteoporózy (viz obrázek na str. 19-22). Stanovení PINP se využívá i při diagnostice kostního rozsevu solidních tumorů a mnohočetného myeomu, čili slouží také jako tumorový marker.  
**Test IDS-iSYS intact PINP** na stanovení intaktního PINP pro automatické zpracování dodává firma IDS (ImmunoDiagnosticSystems).
- *Osteokalcin*: 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

## 19.5.3.1.2. 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 propojením 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, INTP).
- PYD a DPD volný či celkový se z krve dostávají do moči, kde se 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, ICTP, CTX).** Vzniká při degradaci kolagenu pomocí matrixových metaloproteáz (viz str.19-23). Hladina ICTP 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, INTp, NTx, NTx).** INTp je biomarker rychlosti kostního obratu a měří se v moči nebo v séru. Na rozdíl od ICTP hladiny INTp kolísají ze dne na den, aniž by byl pacient léčen. Hladiny INTp se tedy nedají použít ke zhodnocení efektu léčby. ICTP má využití i jako tumorový marker (osteolytické metastázy). ICTP a INTp se stanovují imunoanalyticky nebo metodami HPLC.
- **C-terminální lineární telopeptidy (CTx),** vznikají účinkem *katepsinu K* (viz str. 19-23). Existují tak dvě (odlišná) imunostanovení pro karboxyterminální telopeptidy - ICTP a CTx.



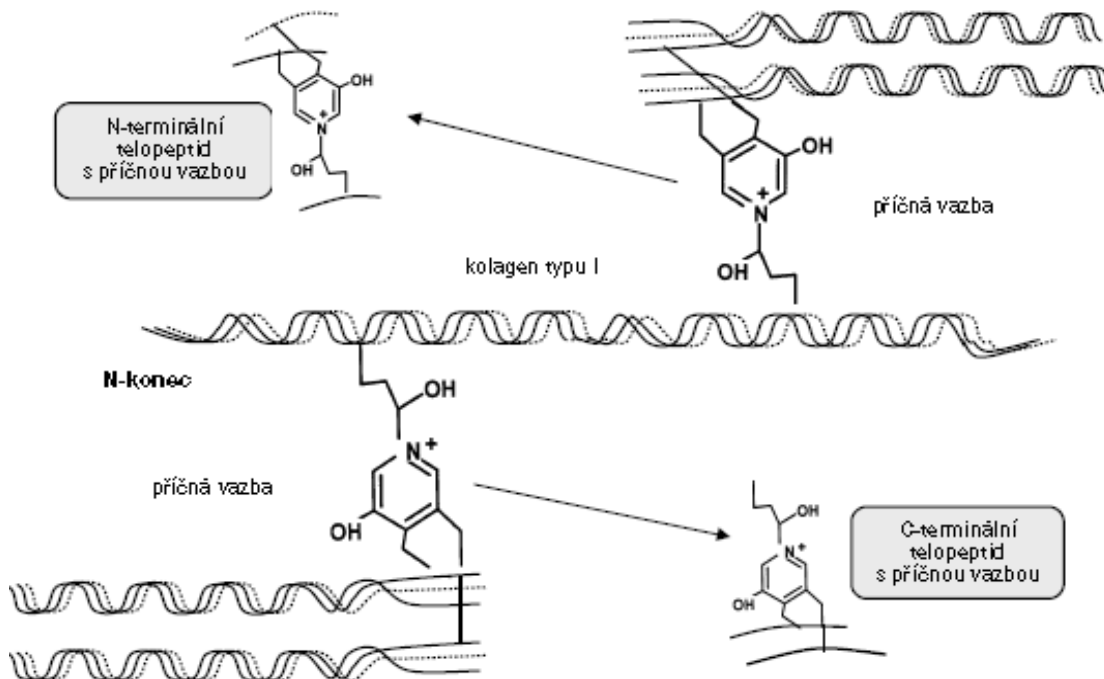
**Pyridinolin**

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

**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 mění na 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-gb/dvd/>

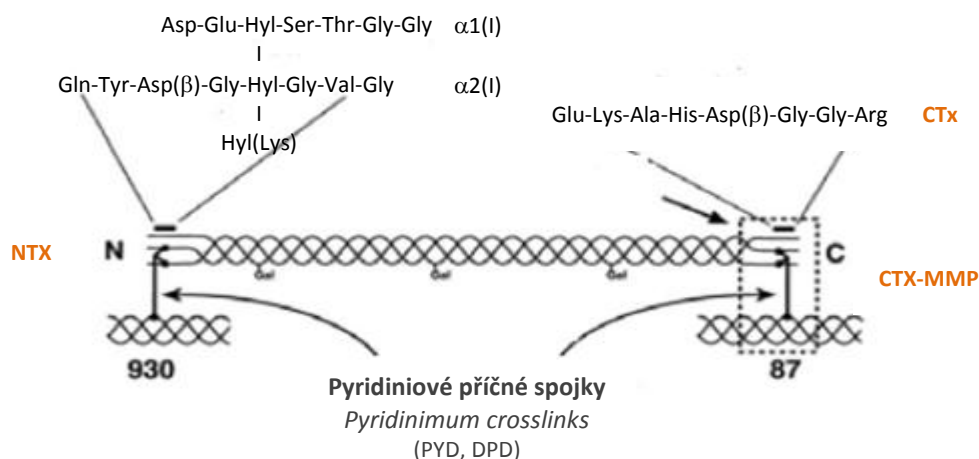
**INTP, ICTP, PYD, DPD**



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*



### Molekulární zdroje markerů kolagenové degradace



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

**Příčně spojené telopeptidy** (crosslinked telopeptides):

- **ICTP** (CTx-MMP, C-koncový příčně spojený [kroslinkový] telopeptid kolagenu typu I, uvolněný matrixovými prote(in)ázami; metoda: imunochemie)
- **CTx** (lineární oktapeptid z odvozený z C-koncového telopeptidu kolagenu typ I, uvolněný katepsinem K); metoda: ELISA, HPLC
- **NTX** (N-koncový příčně spojený telopeptid kolagenu typu I, INCP; metoda: ELISA, HPLC)

- **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 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, zmrazení)
- analytickými faktory (typ antigenu a použité protilátky, specifita testu, tj. vliv interferujících látek apod.)

Markery kostního metabolismu doplňují denzitometrii (měření hustoty = 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 <sub>i</sub> , ALP, GMT, dU-Ca	Hyperkalcemický a hypokalcemický syndrom, Pagetova kostní choroba	fS-Ca <sup>2+</sup> , iPTH, iso-ALP, 25-hydroxycholecalciferol 2-hodinový test: fU-Ca, P <sub>i</sub> , renální tubulární práh pro fosfáty
fP-osteokalcin	Hyperkortizolismus	dU-volný kortizol
fS-TSH	Hypertyreóza	fS-T <sub>3</sub> , T <sub>4</sub>
fS-testosteron (muži)	Hypogonadismus	fS-volný testosteron, LH
fS-ELFO bílkovin	Mnohočetný myelom	diferenciální diagnostika paraproteinémie

*iPTH = imunoreaktivní parathormon*

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

**19.6. Stručné shrnutí kapitoly**

- Markery jsou látky, z jejichž přítomnosti v tělních tekutinách můžeme usuzovat na patologické procesy v organismu
- Kapitola se zaměřila zejména na markery maligních procesů, postižení myokardu, patologie kostního metabolismu, akutního ledvinového selhání, zánětu a sepse.

**19.6.1. Tumorové markery**

- Nádorové (tumorové) markery jsou substance nacházející se v nádoru, nebo jsou nádorem produkovány, nebo jsou produkovány jako odpověď hostitele na přítomnost nádoru.
- Nádorové markery lze využít k odlišení nádoru od normální tkáně, nebo k úvaze o přítomnosti nádoru v organismu. Hlavní využití nádorových markerů je při sledování léčby.
- Nádorové markery jsou antigeny, hormony, receptory hormonů, enzymy, různé jiné bílkoviny, mutace v DNA, proteinové produkty onkogenů aj.
- Zvýšené hladiny tumorových markerů se mohou vyskytovat i u nemaligních onemocnění, naopak, u tumorů se někdy vyskytnout nemusí. Žádný tumorový marker nemá 100% ani specifitu, ani senzitivitu.
- Metody stanovení tumorových markerů jsou různorodé, používají se metody chemické i imunochemické, i metody molekulární biologie. Mnoho tumorových markerů lze stanovit imunochemickými ligandovými technikami. Moderní přístroje využívají čipové technologie.

**19.6.2. Markery postižení myokardu**

- Markery akutního koronárního syndromu a infarktu myokardu jsou kardiální troponiny (cTnI, cTnT), bílkoviny podílející se na svalovém stahu.
- Zvýšená hodnota cTn znamená poškození myokardu, i když ne vždy musí jít o ischemii. Znamená to, že na zvýšení hladiny cTn se podílí nejen nekróza kardiocytů, ale i další jevy. Na to je nutno pamatovat při interpretaci výsledků
- Troponiny se stanovují imunochemicky pomocí specifické protilátky.
- Za cut off u dané metody stanovení cTn je brána hodnota koncentrace příslušného troponinu odpovídající 99. percentilu hodnota zdravé populace, změřená s precizností VK ≤ 10%.
- Tento požadavek splňují tzv. vysoce senzitivní (high sensitive) diagnostické soupravy.
- Tyto soupravy navíc umožňují s dostatečnou přesností identifikovat menší poškození myokardu, než tomu bylo dříve, jak u akutních tak u chronických onemocnění myokardu.
- Negativním markerem akutního infarktu myokardu je kopeptin, C-terminální část prekursoru vazopresinu. Současný negativní nálezní troponinu a kopeptinu vylučuje akutní infarkt myokardu.
- Za prakticky překonané markery infarktu myokardu se považují CK, CK-MB a LD.

- Na srdeční selhání (a jeho stupeň) lze usuzovat z hodnot natriuretických peptidů, hormonálně aktivních látek, ovlivňujících zejména činnost ledvin (diurézu). Využívají se zejména BNP, NT-proBNP a ANP. Stanovují se imunochemicky.
- Zkoumají se i další látky, které by mohly být markery srdečního selhání: DC146, galštin-3, proadrenomedulin a ST-2.

### 19.6.3. Markery zánětu

- Markery zánětu jsou zejména proteiny akutní fáze, tj. proteiny syntetizované játry .
- Syntézy těchto bílkovin může být při zánětu zvýšena (pozitivní reaktanty akutní fáze) nebo snížena (negativní reaktanty akutní fáze).
- Nejvíce rozšířeným stanovením je stanovení C-reaktivního proteinu (CRP). Výrazně se zvyšuje zejména u bakteriálních infekcí, může tak sloužit k odlišení bakteriální a virové infekce.
- Prokalcitonin, prekurzor kalcitoninu, ale syntetizovaný v játrech, je citlivým indikátorem bakteriální infekce a těžkých sepsí. Stanovuje se semikvantitativně imunochromatograficky, nebo ligandovou technikou.
- Presepsin, subtyp solubilního CD14, se uvádí jako nový marker sepse. Oproti prokalcitoninu není významně přínosnější.
- Dalšími markery zánětu jsou sérový amyloid A, výhodný zejména při současném stanovení s CRP, kdy výsledek zcitlivuje, dále IL-6, cytokin, který v kombinaci s CRP nebo se sérovým amyloidem A představuje nejlepší marker novorozenecké sepse a elastáza z granulocytů a neopterin

### 19.6.4. Markery akutního selhání ledvin

- Klasickým markerem činnosti ledvin je hodnota kreatininu, který ale na akutní selhání ledvin (AKI) reaguje poměrně pozdě.
- Moderním markerem AKI je neutrofilní lipokalin asociovaný s želatinázou, NGAL. Stanovuje se imunochemicky.
- Dalšími markery jsou (snad) albumin a molekula poškození ledvin 1, KIM-1. Poměrně specifickým ukazatelem ischemického poškození ledvin je IL-18.

### 19.6.5. Markery metabolismu kostí

- Markery metabolismu kostí (kostní remodelace) se dělí na markery kostní novotvorby a markery osteoresorpce.
- Markery kostní novotvorby jsou kostní frakce sérové alkalické fosfatázy, sérový GLS protein (osteokalcin) a sérové C- a N-terminální propeptidy prokolagenu typu I (PICP, PINP).
- Markery kostní resorpce jsou hydroxyprolin v moči, glykosidy hydroxylysinu v moči, volný a celkový pyridinolin (fPYD, tPYD), kroslinkové telopeptidy kolagenu typu I: C-terminální (ICTP), uvolněný na zinku závislou metaloproteázou, N-terminální (INTP), dále C-koncový telopeptid CTx, uvolněný katepsinem K a tartarát rezistentní plazmatická kyselá fosfatáza.
- Klinický význam těchto markerů pro diagnostiku a monitoring kostních chorob je předmětem diskuse, interpretace výsledků vyžaduje značnou zkušenost a vlastní provedení i laboratoř s návazností na specializovanou ambulanci.

## 19.7. Doplnky

### 19.7.1. Definice infarktu myokardu (pro zvědavé studenty)

#### Kritéria pro akutní infarkt myokardu

Pojem akutní infarkt myokardu (AIM) by měl být užíván tehdy, **je-li k dispozici průkaz myokardiální nekrózy v klinické situaci odpovídající akutní myokardiální ischemii.**

Za těchto podmínek je ke stanovení diagnózy IM zapotřebí splnit libovolné z následujících kritérií:

- Detekce vzestupu a/nebo poklesu hodnot srdečních biomarkerů (nejlépe srdečního troponinu [cTn]), když alespoň jedna hodnota přesahuje 99. percentil pro normální referenční populaci a je přítomen alespoň jeden z následujících:
  - Symptomy ischemie myokardu.
  - Nové nebo předpokládané nové významné změny úseku ST – vlny T (ST–T) nebo nově vzniklá blokáda levého Tawarova raménka (BLRT).
  - Vývoj patologických kmitů Q v EKG záznamu.
  - Zobrazení nové ztráty viabilního myokardu či nové regionální poruchy hybnosti srdeční stěny.
  - Identifikace intrakoronárního trombu při angiografii nebo pitvě.
- Srdeční smrt se symptomy nasvědčujícími myokardiální ischemii a s předpokládanými novými ischemickými změnami na EKG nebo s novou BLRT, pokud smrt nastala před vyšetřením srdečních biomarkerů nebo dříve, než jejich hodnoty mohly být zvýšeny.
- IM související s perkutánní koronární intervencí je arbitrárně definován elevací hodnot cTn (na > **pětinásobek** 99. percentilu URL) u pacientů s normálními výchozími hodnotami ( $\leq$  99. percentil URL) či vzestupem hodnot cTn o > 20 %, pokud byly výchozí hodnoty elevovány a jsou stabilní nebo klesají. **Navíc je vyžadován alespoň jeden z následujících:**
  1. symptomy nasvědčující myokardiální ischemii,
  2. nové ischemické změny na EKG,
  3. angiograficky nález odpovídající komplikaci zákroku nebo
  4. zobrazení nové ztráty viabilního myokardu či nové regionální poruchy hybnosti srdeční stěny.
- Trombóza stentu spojená s IM detekovaná koronární angiografií nebo při pitvě v podmínkách myokardiální ischemie a se vzestupem nebo poklesem hodnot srdečních biomarkerů, z nichž alespoň jedna je nad 99. percentilem URL.
- IM související s provedením aortokoronárního bypassu (CABG) je arbitrárně definován elevací hodnot srdečních biomarkerů (na > **desetinásobek** 99. percentilu URL) u pacientů s normálními výchozími hodnotami cTn ( $\leq$  99. percentil URL). **Navíc je vyžadován alespoň jeden z následujících:**
  1. nové patologické kmity Q či BLRT,
  2. angiograficky doložená nová okluze štěpu nebo nativní koronární tepny nebo
  3. zobrazení nové ztráty viabilního myokardu či nové regionální poruchy hybnosti srdeční stěny.

#### Kritéria pro překonaný infarkt myokardu

Pro stanovení diagnózy překonaného IM musí být splněno jedno libovolné z níže uvedených kritérií:

- Patologické kmity Q se symptomy či bez nich, a to při vyloučení neischemických změn.
- Zobrazení oblasti bez viabilního myokardu, která je ztenčena a nekontrahuje se, a to při vyloučení neischemických změn.
- Patologickoanatomický průkaz překonaného IM

**19.7.2. Zkratky použité v textu o tumorových markerech**

<b>AFP</b>	$\alpha$ -fetoprotein	<b>NSE</b>	neuron-specifická enoláza	<b>TPS</b>	specifický TPA
<b><math>\beta</math>-hCG</b>	$\beta$ -podjednotka hCG	<b>PSA</b>	prostata/prostatický specifický antigen	<b>TSH</b>	thyreotropin
<b><math>\beta_2</math>M</b>	$\beta_2$ -mikroglobulin	<b>fPSA</b>	volný PSA	<b>T3</b>	trijódthyronin
<b>CEA</b>	karcinoembryonální antigen	<b>tPSA</b>	celkový PSA	<b>ft3</b>	volný trijódthyronin
<b>FER</b>	ferritin	<b>SCCA</b>	antigen skvamózních buněk	<b>T4</b>	tetrajódthyronin, thyroxin
<b>hCG</b>	lidský choriogonadotropin	<b>SP1</b>	$\beta_1$ -specifický glykoprotein	<b>ft4</b>	volný tetrajódthyronin
<b>MCA</b>	antigen mucinózních karcinomů	<b>TK</b>	thymidinkináza		
<b>MSA</b>	mammární sérový antigen	<b>TPA</b>	tkáňový polypeptidový antigen		

## OBSAH:

Kapitola 19 Biomarkery.....	19-1
19.1. Nádorové markery.....	19-1
19.1.1. Přehled některých tumorových markerů a jejich klinické využití.....	19-4
19.1.2. Charakteristika některých vybraných nádorových markerů.....	19-7
19.1.2.1. CEA (karcinoembryonální antigen).....	19-7
19.1.2.2. AFP (alfa1-fetoprotein).....	19-7
19.1.2.3. PSA, fPSA (prostata specifický antigen).....	19-7
19.1.2.4. hCG (lidský choriogonadotropní hormon - viz kapitola 14., str. 14-35).....	19-8
19.1.2.5. CA 15-3.....	19-9
19.1.2.6. CA 125.....	19-9
19.1.2.7. CA 19-9.....	19-9
19.1.2.8. CA 72-4.....	19-9
19.1.2.9. SCCA (antigen skvamózních buněk; SCC antigen).....	19-10
19.1.2.10. NSE (neurospecifická enoláza).....	19-10
19.1.2.11. TK (thymidinkináza).....	19-10
19.1.2.12. TPA, TPS (tkáňový polypeptidický a tkáňový polypeptidický specifický antigen).....	19-10
19.1.2.13. CYFRA 21-1.....	19-11
19.1.2.14. HE4.....	19-11
19.2. Markery postižení myokardu.....	19-12
19.2.1. Troponiny.....	19-12
19.2.2. Kopeptin.....	19-13
19.2.3. Natriuretické peptidy.....	19-14
19.2.4. BNP a NT-proBNP.....	19-15
19.3. Markery zánětu.....	19-16
19.3.1. Proteiny akutní fáze.....	19-17
19.3.1.1. Pozitivní reaktanty akutní fáze.....	19-18
19.3.1.2. Negativní reaktanty akutní fáze.....	19-18
19.4. Markery akutního selhání ledvin.....	19-20
19.4.1. Kritéria pro hodnocení poškození funkce ledvin.....	19-20
19.5. Markery metabolismu kostí.....	19-21
19.5.1. Kolagen a další bílkoviny obsažené v kostech.....	19-21
19.5.2. Kostní choroby.....	19-24
19.5.3. Laboratorní vyšetření u nemocných s kostním onemocněním.....	19-24
19.5.3.1. Markery kostního metabolismu.....	19-24
19.5.3.1.1. Markery kostní novotvorby.....	19-25
19.5.3.1.2. Markery osteoresorpce.....	19-25
19.6. Stručné shrnutí kapitoly.....	19-28
19.6.1. Tumorové markery.....	19-28
19.6.2. Markery postižení myokardu.....	19-28
19.6.3. Markery zánětu.....	19-29
19.6.4. Markery akutního selhání ledvin.....	19-29
19.6.5. Markery metabolismu kostí.....	19-29
19.7. Doplnky.....	19-30
19.7.1. Definice infarktu myokardu (pro zvědavé studenty).....	19-30
19.7.2. Zkratky použité v textu o tumorových markerech.....	19-31