

## Biomarkery v konskej medicíne

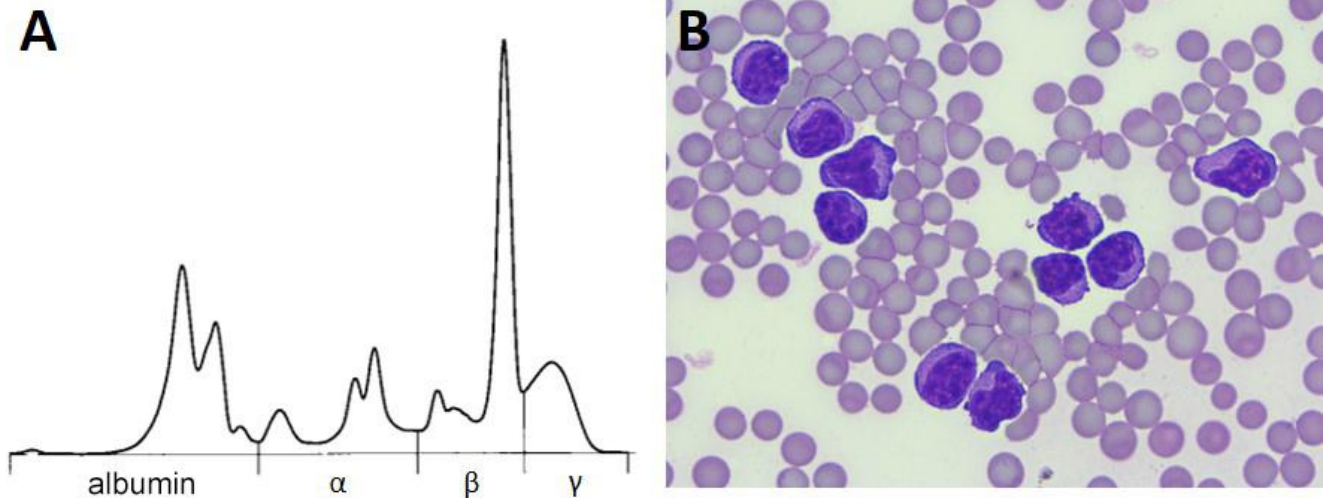
Vo veterinárnej medicíne, podobne ako v humánnej, v posledných rokoch výrazne vzrástol význam neinvazívnych diagnostických a terapeutických prístupov. Preto sa v diagnostike čoraz viac uplatňujú biomarkery. Biomarkery sú merateľné zlúčeniny, ktoré môžu slúžiť ako indikátory rôznych fyziologických alebo patologických procesov, a tak majú prognostický alebo diagnostický význam. V niektorých prípadoch nám biomarkery poskytujú dôležitú dodatočnú informáciu pre kompletne klinické vyšetrenie, a tak sa podieľajú na medicínskom rozhodovaní. Molekulárne biomarkery sa stanovujú v biologických vzorkách (ako sérum, plazma alebo mozgomiešny mok) a môže ísť o špecifické molekuly, enzýmy či hormóny.

Predovšetkým v diagnostike nádorov sa biomarkery používajú ako pomocné neinvazívne nástroje pri určovaní diagnózy, prognózy a monitoringu terapie. V konskej medicíne sa diagnostika nádorov stáva čoraz dôležitejšia kvôli vzrastajúcemu veku konskej populácie. Pre lekára je stále výzvou, keďže techniky zobrazovacej diagnostiky sú u koní limitované (hrudník, brušná dutina). Navyše, konší pacienti trpiaci neoplastickými ochoreniami majú tendenciu vykazovať skôr nešpecifické symptómy ako horúčka, kachexia alebo mierna anémia. Biely krvný obraz často ukazuje len malé zmeny a paraneoplastické syndrómy (ako hyperkalcémia) sú zriedkavé. To nám extrémne sťažuje určenie diagnózy. Equinný lymfóm (lymfosarkóm) je najčastejšie malígne nádorové ochorenie u koní a môže sa manifestovať v gastrointestinálnej, kožnej, mediastinálnej alebo multicentrickej forme (obr. 1). V závislosti od stupňa ochorenia a lokalizácie tumoru odber vzorky na histopatologické vyšetrenie často nie je možný.



**Obr. 1:** Post mortem nálezy u trojročnej islandskej kobyly. V anamnéze mala horúčku, epistaxiu a zhoršený celkový stav. Laboratórna diagnostika ukázala závažnú anémiu (erytrocyty 1,55 T/l, hematokrit 0,08 l/l, hemoglobín 54 g/l) s trombocytopéniou (17 G/l). Histologicky bol potvrdený lymfóm.

V poslednej dobe sa začala používať **timidínkináza** ako marker proliferácie v diagnostike tumorov koní. Je to bunkový enzým, ktorý zohráva rozhodujúcu úlohu počas syntézy DNA, keď je nukleozid tymidín inkorporovaný do DNA. Preto jej koncentrácia v sére pozitívne koreluje s rýchlosťou delenia buniek. Keďže malígne ochorenia hemato-poetického a lymfatického systému (lymfóm, leukémia, multipný myelóm) sú často vysoko proliferatívne, timidínkináza môže byť považovaná za tzv. proliferačný marker. Silný zápal môže viesť k malému zvýšeniu timidínkinázy a je potrebné vziať ho do úvahy ako diferenciálnu diagnózu. V takom prípade by sa mali stanoviť aj proteíny akútnej fázy. Okrem toho, negatívny výsledok nevyklučuje primárne neoplastické ochorenie.



**Obr. 2:** Elektroforéza bielkovín séra: krivka s monoklonálnym píkcom v beta frakcii (A). Tento kôň vykazoval výraznú leukocytózu vrátane početných atypických lymfocytov v periférnej krvi (B), významne zvýšenú koncentráciu sérového amyloidu A (850,15 µg/ml) a hladinu sérovej tymidínkinázy 19,3 U/l (referenčné hodnoty <3 U/l).

**Elektroforéza bielkovín séra** môže byť ďalšou diagnostickou, cenovo výhodnou možnosťou v prípade suspektných nádorov. Monoklonálne zmeny, často v beta a gama frakcii, sú výsledkom excesívnej produkcie špecifického imunoglobulínu klonom plazmatickej bunky. Boli popísané hlavne u lymfoproliferatívnych ochorení (obr. 2 A a B).

Pokiaľ máme podozrenie na neopláziu pečene (napr. hepatocelulárny karcinóm), je možné vyšetrenie **alfa-1-fetoproteínu (AFP)**. AFP je glykoproteín, ktorý sa tvorí fyziologicky perinatálne u žriebät (až do veku 1,5 roka), a je preto zvýšený aj u gravidných zvierat. U dospelých negravidných koní zvýšenie môže indikovať tumor pečene, keďže AFP je produkovaný nádorovými bunkami pečene, pričom je potom jeho zvýšené hladiny možné namerať v sére. **Alkalická fosfatáza (ALP)** sa v diagnostike nádorov pečene používa menej často. Je pravdepodobnejšie, že zvýšené aktivity enzýmu ALP nájdeme pri nádoroch kostí (napr. osteosarkóm), aj keď tie sú u koní skôr zriedkavé.

Vcelku bežným typom nádoru u kobýl je tumor buniek granulózy (GCT). Diagnózu je často možné presvedčivo určiť pomocou stanovenia

**anti-Müller hormónu (AMH)**. AMH je glykoproteín, ktorý ovplyvňuje pohlavnú diferenciáciu počas embryonálneho vývoja a je tvorený bunkami granulózy počas folikulogenézy u dospelých kobýl a Sertolliho bunkami tkaniva semenníkov u samcov. Anti-Müller hormón je preto možné využiť ako laboratórne diagnostický marker nielen pri diagnostike tumorov, ale aj pri rôznych iných klinických problémoch.

Pre diagnostiku tumorov buniek granulózy je AMH najsenzitívnejší diagnostický marker (98%) v porovnaní s inhibínom (80-90%) a testosterónom (50%). Typicky tieto kobyly vykazujú klinické príznaky anestrú, veľmi nízke hodnoty progesterónu (<1 ng/ml) a unilaterálne zväčšené ovárium s nápadným voštinovým vzhľadom na ultrazvuku. Kontralaterálne ovárium je naopak väčšinou výrazne zmenšené. Často pomocou ultrazvuku nie je možná jasná diferenciácia od ostatných ovariálnych ochorení, ako je ovariálny hematóm, teratóm alebo cystadenóm. Stanovenie AMH tu môže pomôcť, nakoľko sa vo veľkých množstvách tvorí bunkami granulózy. Pokiaľ nám stanovenie AMH neposkytne spoľahlivý výsledok (napr. ak sa tumor buniek granulózy len začína vyvíjať), opakovanie testu sa odporúča najskôr za 3-4 mesiace. Diagnostika GCT stanovením AMH je možná aj

počas gravidity, nakoľko sérová hladina AMH, na rozdiel od testosterónu alebo inhibínu, zostáva v neskorých štádiách gravidity nezmenená.

V normálnom cykle kobyly tiež nedochádza k významným fluktuáciám AMH a na rozdiel od testosterónu, (ktorý sa tvorí aj v kôre nadobličiek) je produkovaný len v samotnom ováriu. U starších kobýl (>20 rokov) sa môže objaviť zníženie hladiny AMH, ktoré koreluje so znížením rezervy (primordiálnych) folikulov.

Stanovenie AMH môže byť užitočné aj u žrebcov. Na rozdiel od estrónsulfátu je koncentrácia AMH spoľahlivá pri diagnostike kryptorchizmu bez ohľadu na vek, a tak predstavuje užitočný biomarker pre prítomnosť testikulárneho tkaniva. Bazálna hladina testosterónu u kryptorchidných žrebcov môže byť nízka alebo hraničná a pri samostatnom stanovení nám poskytuje len obmedzenú informáciu. Testosterón by mal byť preto meraný vždy pri realizácii hCG stimulačného testu (bazálna a stimulovaná hodnota).

Kvôli skôr dlhšiemu polčasu rozpadu (1,5-2 dni) má stanovenie AMH zmysel minimálne 2 týždne po kastrácii. Vtedy sérové koncentrácie už dostatočne klesli a diagnostika je spoľahlivá. Počas týchto 14 dní je vhodnejším parametrom testosterón, pretože má podstatne kratší polčas rozpadu (cca 1 hod). Veľmi nízke hladiny AMH u intaktných žrebcov môžu indikovať testikulárnu degeneráciu alebo sú spôsobené sezónou (jeseň/zima). S vekom spojená testikulárna degenerácia je u žrebcov obvyklejšia vo vysokom veku, hladiny AMH však nepodávajú informáciu o plodnosti zvieratá. Na druhej strane, veľmi vysoké hladiny v kombinácii s klinickými príznakmi môžu byť indikátorom tumoru Sertolliho buniek, čo je vždy potrebné vyjasniť pomocou histopatologického vyšetrenia.

Biomarkery nezohrávajú úlohu len pri diagnostike tumorov. Pokiaľ máme podozrenie na zápalový proces, proteíny akútnej fázy ako **sérový amyloid A (SAA)** alebo **fibrinogén** môžu pomôcť zhodnotiť klinicky nerozpoznatelnú závažnosť zápalu alebo posúdiť úspešnosť terapie.

Vo všeobecnosti sa proteíny akútnej fázy rozdeľujú na negatívne, ktorých hladina v sére klesá počas odpovede akútnej fázy (napr. albumín) a pozitívne, ktoré sa naopak pri zápale zvyšujú.

Pozitívne proteíny akútnej fázy môžu byť silné (rýchle 10- až 1000-násobné zvýšenie v krátkom čase), stredné (pomalé 5- až 10- násobné zvýšenie s plateau fázou) alebo slabé proteíny akútnej fázy (0,5- až 5-násobné zvýšenie). Tvorba proteínov akútnej fázy sa spúšťa počas akútnej fázy zápalovej odpovede. Je to skorá, nešpecifická systémová reakcia na tkanivové poškodenie infekciou (bakteriálnou, vírusovou alebo parazitárnou), traumou alebo neopláziou. Okrem lokálnych a systémových účinkov uvoľnenie zápalových mediátorov (ako sú prozápalové cytokíny) stimuluje syntézu proteínov akútnej fázy v hepatocytoch pečene.

U koní sa v klinickej laboratórnej diagnostike čoraz častejšie využíva stanovenie **SAA** ako silného proteínu akútnej fázy. SAA je apolipoproteín, ktorý na jednej strane chemotakticky priťahuje zápalové bunky do oblasti zápalu, ale na druhej strane suprimuje proliferáciu lymfocytov. U zdravých koní je možné sérový SAA detegovať len vo veľmi nízkych koncentráciách. V prítomnosti škodlivého činiteľa koncentrácia vzrastá veľmi rýchlo (do 6-12 h) a veľmi výrazne (100- až 1000- násobne). Po vymiznutí pôvodcu zasa rýchlo klesá (do 12 h). SAA je veľmi senzitívnym markerom skorého zápalového procesu, ktorý môže byť veľmi dôležitým pomocníkom v diagnostike, monitoringu a určovaní prognózy. Obzvlášť keď je nevyhnutný urýchlenný zásah, napríklad v medicíne žriebät, hladiny SAA môžeme merať, aby sme detegovali septikémiu, bakteriálnu pneumónou alebo septickú artritídu už v počiatočnom štádiu. Sérové hladiny SAA môžu tiež pomôcť diferencovať bakteriálne a vírusové infekcie, mali by byť však vždy interpretované v kontexte celkového klinického vyšetrenia a ostatných laboratórnych parametrov, keďže SAA je nešpecifický proteín akútnej fázy. Mierne zvýšené hladiny môžeme namerať po strese, transporte, vakcinácii alebo ťažkej námahe. Navyše, zvýšenie SAA by nikdy

nemalo byť jediným kritériom pre nasadenie antibiotickej liečby. Biely krvný obraz, klinická chémia a ostatné markery zápalu a samozrejme klinické a bakteriologické vyšetrenia by mali byť zahrnuté do diagnostického postupu.

**Fibrinogén**, ktorý je stredným proteínom akútnej fázy, sa tiež v konskej medicíne využíva ako diagnostický nástroj. V porovnaní s SAA v prvých 24 hodinách po pôsobení kauzálneho agensa vzrastá len dvojnásobne a vrchol dosahuje za cca 48 hodín. Fibrinogén môže zostať zvýšený aj niekoľko týždňov, preto nie je senzitívny pre monitoring. Jeho stanovenie je možné len z citrátovej plazmy.

Rýchla a skorá diagnóza nie je relevantná len pri akútnom zápale, ale aj pre orgány s nízkou regeneráciou, ako je srdcový sval. Užitočným biomarkerom akútnej myokardiálnej nekrózy je kardiálny **troponín I**, ktorý môže byť u koní

použitý ako špecifický srdcový parameter. Kardiálne troponíny sú proteíny, ktoré zohrávajú úlohu v regulácii kontrakcie a relaxácie myokardu. Po poškodení buniek je možné namerať zvýšené sérové hladiny kardiálneho troponínu po cca 5 - 7 hodinách. Príčiny môžu byť vírusové alebo bakteriálne, vrodené srdcové choroby, deficiencie, toxíny alebo neoplázie.

### Zhrnutie

V klinickej laboratórnej diagnostike máme k dispozícii niekoľko rozličných, veľmi senzitívnych biomarkerov. Samostatne alebo v kombinácii môžu poskytnúť vhodnú pomoc v praxi z hľadiska diagnostiky, hodnotenia prognózy a predpovedania terapeutického úspechu, ako aj podporu pri rozhodovaní o liečbe.

*Svenja Möller*

Parameter	Indikácia	Materiál vzorky
tymidínkináza	lymfoproliferatívna neoplázia	sérum, centrifugované, chladené
alfa-1-fetoproteín (AFP)	tumor pečene	sérum
alkalická fosfatáza	pečeňový parameter, tumory kostí	sérum
anti-Müller hormón (AMH)	tumor buniek granulózy, kryptorchizmus	sérum, centrifugované, chladené
sérový amyloid A (SAA)	zápal	sérum
fibrinogén	zápal	citrátová plazma
troponín I	akútne myokardiálne poškodenie	sérum, centrifugované, chladené