

616.349-006.6-074:577.15

POUŽITÍ NĚKTERÝCH ENZYMŮ A IZOENZYMŮ V DIAGNOSTICE KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

RNDr. Miloš TICHÝ, CSc., MUDr. Jan BUREŠ, CSc., MUDr. Pavel JANDÍK

Vojenská lékařská akademie JEP, Hradec Králové

(náčelník: plk. doc. MUDr. Josef Fusek, DrSc.)

II. interní klinika FNŠP KÚNZ, Hradec Králové

(přednosta: prof. MUDr. Vladimír Pidrman, DrSc.)

I. chirurgická klinika FNŠP KÚNZ, Hradec Králové

(přednosta: doc. MUDr. Theodóz Suchý, CSc.)

Věnováno k 60. narozeninám plk. prof. MUDr. Vladimíra Pidrmána, DrSc.

Doba přežití nemocných s kolorektálním karcinomem je závislá na stadiu invaze tumoru a tím především na jehočasné diagnóze. Z těchto důvodů je vynakládáno velké úsilí při hledání jak specifických, tak i univerzálních nádorových markerů. I když ideální nádorový marker, který by byl pozitivní u všech nemocných se specifickým tumorem není znám, jsou v praxi používané markery užitečné pro včasné rozpoznání, diagnostiku a monitorování průběhu onemocnění a léčby nádorů. Nádorové markery můžeme rozdělit (6):

1. markery odvozené od nádorové tkáně

– nádorové antigeny:

- a) onkofetální antigeny (alfa-1 fetoprotein, karcinoembryonální antigen, pankreatický onkofetální antigen)
- b) onkoplacentární antigeny (SP₁-glykoprotein)
- c) nádorové antigeny prokazatelné monoklonálními protilátkami, tzv. „neo-antigeny“ (CA 19-9 „GICA“, CA 12-5, CA 50, CA 15-3)
- d) růstové faktory a receptory růstových faktorů (epidermální růstový faktor, receptor pro interleukin 2)
- e) paraproteiny

– metabolicky aktivní látky:

- a) hormony (choriový gonadotropin)
- b) enzymy (prostatická kyselá fosfatáza, Reganův izoenzym alkalické fosfatázy)
- c) metabolity (kyselina vanilmandlová, polyaminy)

2. Látky sdružené s růstem nádoru:

- a) enzymy (laktátdehydrogenáza, kreatinkináza, gama glutamyltransferáza, lysozym)
- b) bílkoviny krevní plazmy (beta-2 mikroglobulin, ferritin, proteiny akutní fáze)
- c) ostatní nespecifické markery (kyselina sialová, Ca⁺⁺)

Studium enzymových aktivit u osob, u kterých se předpokládá vysoké riziko pro výskyt malignity, je relativně nové. V posledních letech je pozornost soustředěna především na izoenzymy kreatinkinázy. Proto jsme se v naší práci zaměřili na ověření významu stanovení kreatinkinázy (dále CK), laktátdehydrogenázy (dále LD) a jejich izoenzymů a na stanovení lysozymu. Tyto enzymové markery jsme srovnávali s markery, které se nám i jiným autorům (4, 11) jevily jako nejcitlivější, tj. karcinoembryonální antigen (dále CEA), C-reaktivní protein (dále CRP), kyselina sialová a poměr alfa-1 orozomukoidu: prealbuminu (dále CSI).

Zkoumaná sestava a použité metody

Zkoumanou sestavu tvořilo 22 nemocných, průměrného věku 60,2 roku (15 mužů, 7 žen) s nádory zažívacího traktu. Jednalo se 14krát o karcinom rektu, 3krát o karcinom sigmoidea a 5krát o jinou lokalizaci tračníku. Diagnóza byla ověřena operačně i histologicky. Kontrolní skupinu tvořilo 20 dárců krve odpovídajícího věku.

Ve vzorcích séra jsme určovali tyto biochemické parametry: CSI, CRP, oba parametry metodou jednoduché radiální imunodifúze. Alfa-1 orozomukoid a prealbumin za pomoci souprav IDP, SEVAC, Praha a CRP za použití antiséra ze Šarišských Michalů ze soupravy Sevatest CRP a standardy CRP-Standard-Serum, fy Behring. Koncentraci kyseliny sialové jsme stanovili enzymaticky, soupravami fy Boehringer Mannheim. Aktivitu lysozymu jsme určovali soupravami Testomar Lysozyme Mono, fy Boehringer Marburg. Koncentraci CEA soupravami OPIDI-RIA-CEA-Kit, Swierk, Polsko a AFP soupravami RIA-test-AFP z Ústavu radioekologie a využití jadrové techniky z Košic. Aktivitu LD jsme určovali soupravami fy Imuna Šarišské Michalany a CK soupravami CK 50 AM fy Lachema Brno. Izoenzymy LD byly stanoveny po elektroforetickém rozdělení na fóliích acetylované celulózy (TITAN III) „sendvič“ metodou a vyhodnoceny na denzitometru CliniScan, fy Helena Laboratories, USA. Izoenzymy CK byly určeny po elektroforetickém rozdělení na agaróze reagenciemi ze soupravy Creatine Phosphokinase Isoenzymes 715-EP, fy Sigma, USA.

Získané výsledky byly statisticky zpracovány nepárovým t-testem v laboratoři lékařské kybernetiky VLA JEP v Hradci Králové.

Výsledky

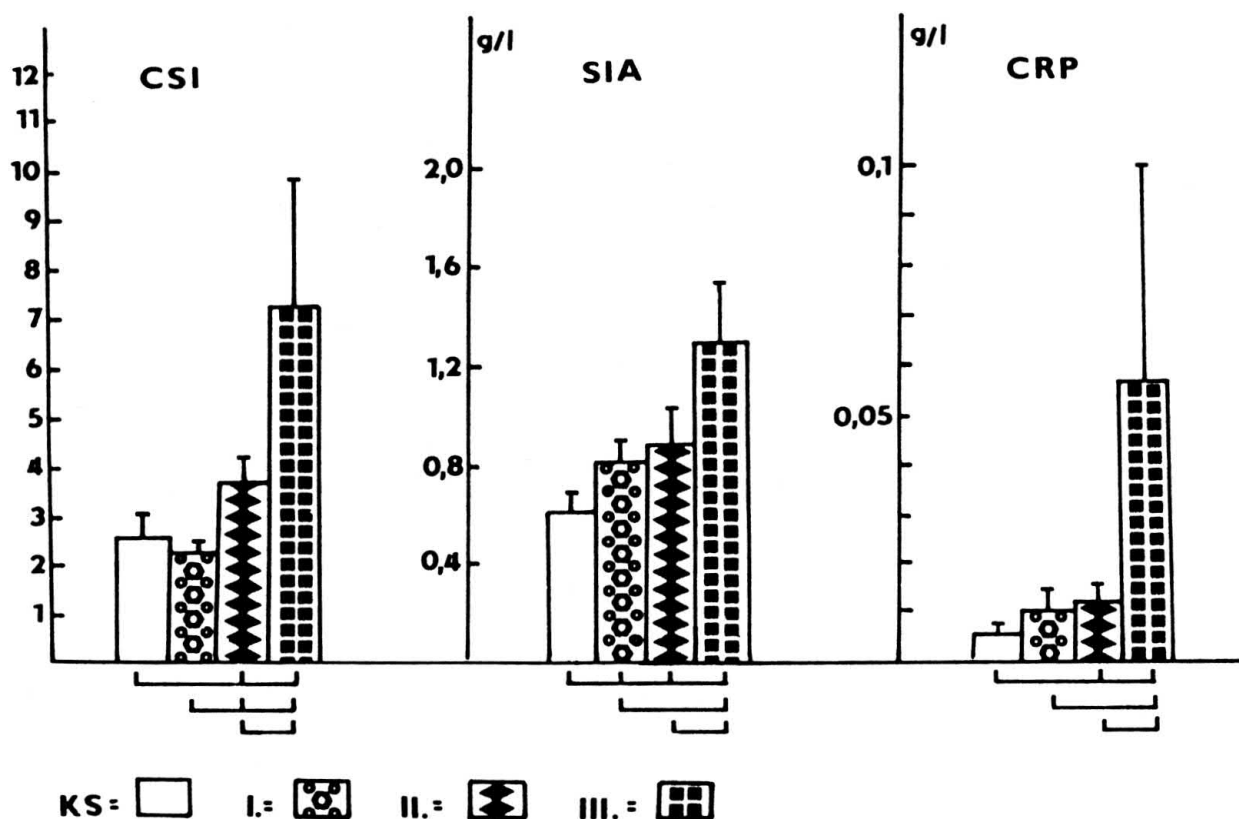
Podle literárních údajů i vlastních zkušeností (1, 11) z dřívější práce s nádorovými markery se nám jako nejcitlivější ukazatel jevil cancer serum index (CSI). Proto jsme jej zvolili k rozdělení zkoumaného souboru do tří skupin: první skupinu (I) tvoří nemocní s $CSI \leq 2,5$, druhou (II) s $CSI = 2,5 - 4,5$ a třetí skupinu (III) nemocní s $CSI \geq 4,5$. Toto rozdělení ukazuje první část grafu č. 1. Všechny výsledky uvádíme přehledně v tabulkách 1 a 2. Grafické znázornění všech výsledků je na grafech č. 1–5. Statisticky významné rozdíly na 5% hladině významnosti mezi jednotlivými skupinami jsou znázorněny svorkami pod grafy. Významné rozdíly jsme prokázali oproti kontrolní skupině pro kyselinu sialovou a CRP, kdežto pro CEA, CK, LD a AFP jsme nezjistili významné rozdíly ani mezi jednotlivými skupinami nemocných navzájem ani oproti kontrolní skupině. Pro lysozym jsme prokázali signifikantní zvýšení aktivity u skupiny III při srovnání s kontrolami. U izoenzymů LD jsme zjistili významně vyšší hodnoty LD₄ a LD₅. Hodnoty LD₁ byly nevýznamně nižší u nemocných oproti kontrolám a hodnoty LD₅ významně vyšší, proto index LD₁ : LD₅ vyšel u všech tří skupin nemocných signifikantně nižší než u kontrolní skupiny.

Tabulka 1

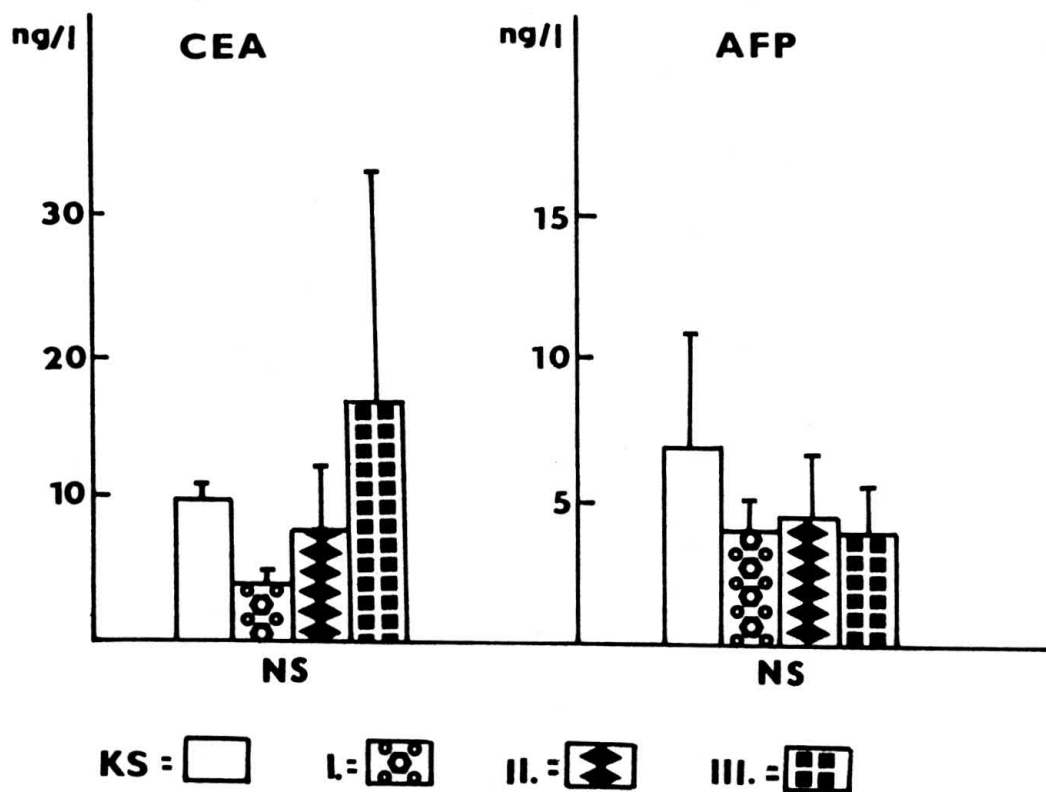
Test	Jednotky	Kontrolní skupina ($\bar{x} \pm SD$)	Nemocní kolorektálním karcinomem ($\bar{x} \pm SD$)		
			I.	II.	III.
CSI	j.	2,5 $\pm$ 0,45	2,2 $\pm$ 0,23	3,61 $\pm$ 0,53	7,12 $\pm$ 2,57
AFP	ng/l	6,94 $\pm$ 4,08	3,87 $\pm$ 0,95	4,17 $\pm$ 2,27	3,71 $\pm$ 1,69
Kys. sial.	g/l	0,61 $\pm$ 0,10	0,79 $\pm$ 0,08	0,86 $\pm$ 0,15	1,27 $\pm$ 0,24
CEA	ng/l	10,1 $\pm$ 1,75	3,7 $\pm$ 0,26	7,72 $\pm$ 4,8	16,5 $\pm$ 17,6
CRP	g/l	0,005 $\pm$ 0,004	0,009 $\pm$ 0,004	0,010 $\pm$ 0,003	0,055 $\pm$ 0,043
CK	μ kat/l	< 3,5	0,59 $\pm$ 0,21	0,37 $\pm$ 0,22	0,91 $\pm$ 0,62
Lysozym	mg/l	1,37 $\pm$ 0,12	1,72 $\pm$ 0,62	1,56 $\pm$ 0,60	2,5 $\pm$ 1,15

Tabulka 2

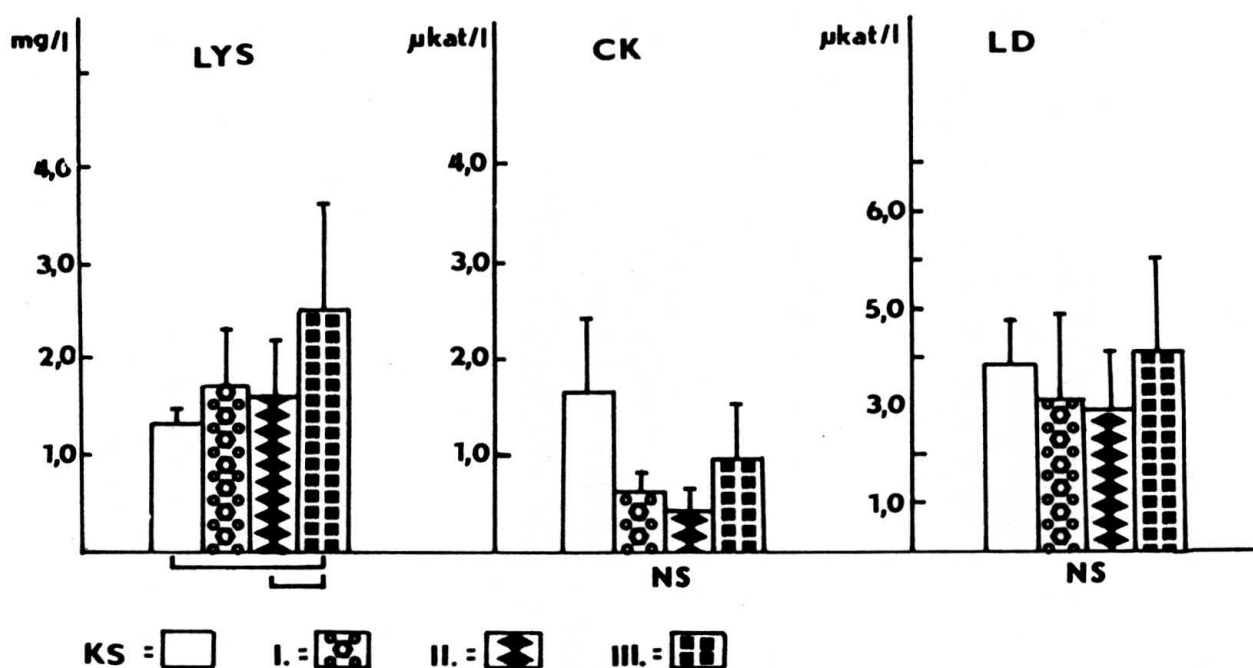
Test	Jednotky	Kontrolní skupina ($\bar{x} \pm SD$)	Nemocní kolorektálním karcinomem ($\bar{x} \pm SD$)		
			I.	II.	III.
LD	μ kat/l	< 6,5	3,20 $\pm$ 1,82	2,93 $\pm$ 1,34	4,1 $\pm$ 2,05
LD ₁	j.	0,24 $\pm$ 0,014	0,20 $\pm$ 0,031	0,20 $\pm$ 0,024	0,21 $\pm$ 0,038
LD ₂	j.	0,33 $\pm$ 0,011	0,28 $\pm$ 0,031	0,28 $\pm$ 0,041	0,28 $\pm$ 0,047
LD ₃	j.	0,26 $\pm$ 0,09	0,22 $\pm$ 0,017	0,26 $\pm$ 0,027	0,23 $\pm$ 0,023
LD ₄	j.	0,086 $\pm$ 0,011	0,135 $\pm$ 0,014	0,129 $\pm$ 0,036	0,124 $\pm$ 0,046
LD ₅	j.	0,086 $\pm$ 0,089	0,143 $\pm$ 0,020	0,124 $\pm$ 0,038	0,151 $\pm$ 0,03
LD ₁ /LD ₅	j.	2,8 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,5	1,9 $\pm$ 0,6	1,6 $\pm$ 0,6



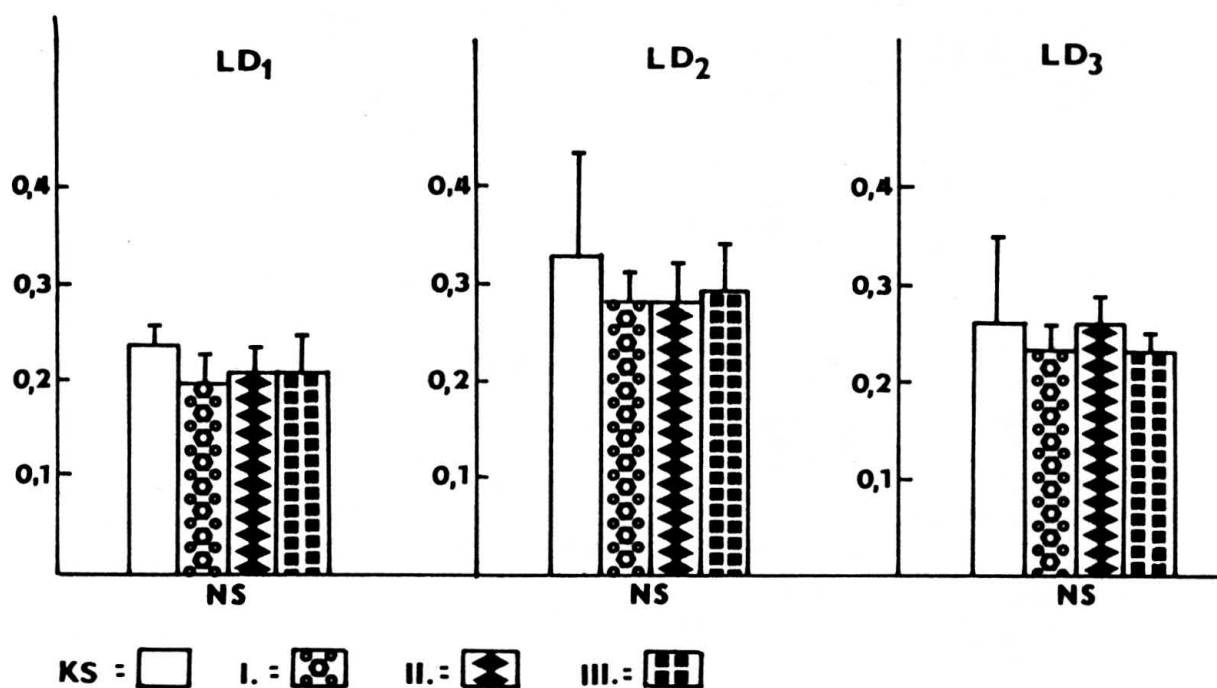
Graf 1 Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky u kontrolní skupiny (KS), u skupiny nemocných I. s $CSI \leq 2,5$, II. s $CSI = 2,5 - 4,5$ a III. s $CSI \geq 4,5$
(CSI = alfa-1 orosomukoid:prealbuminu, SIA = kyselina sialová a CRP = C-reaktivní protein)



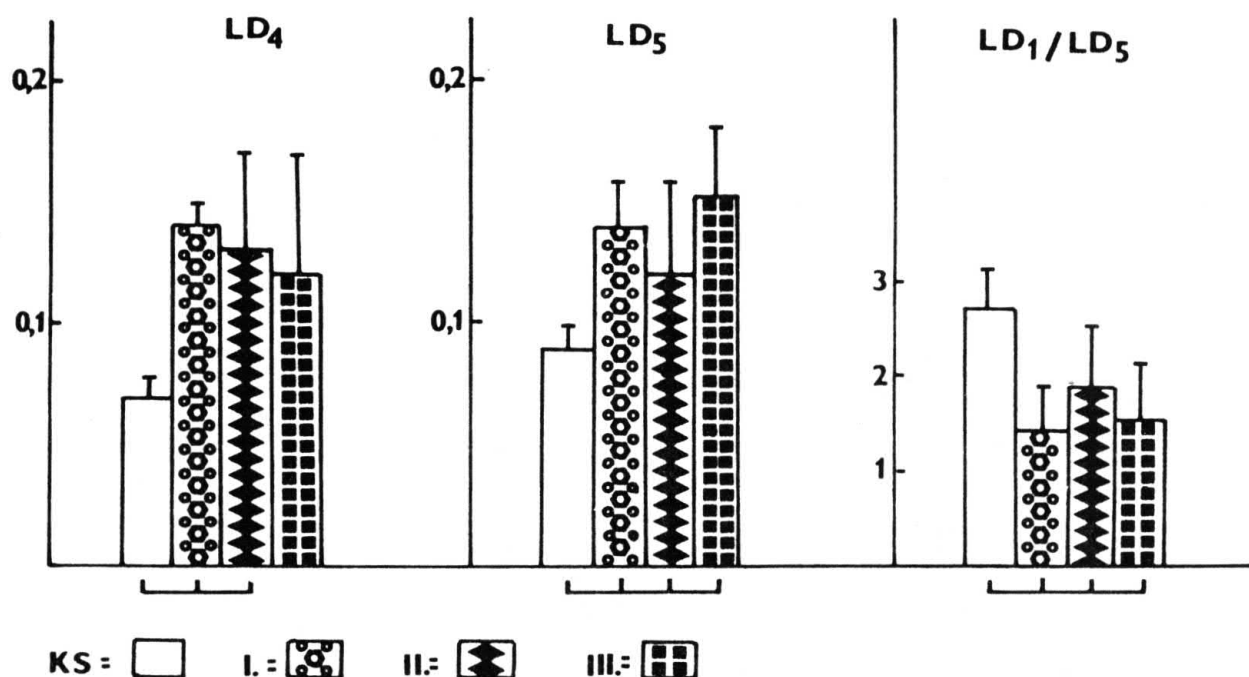
Graf 2 Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky u kontrolní skupiny (KS), u skupiny nemocných I. s $CSI \leq 2,5$, II. s $CSI = 2,5 - 4,5$ a III. s $CSI \geq 4,5$
(CEA = karcinoembryonální antigen, AFP = alfa-1 fetoprotein)



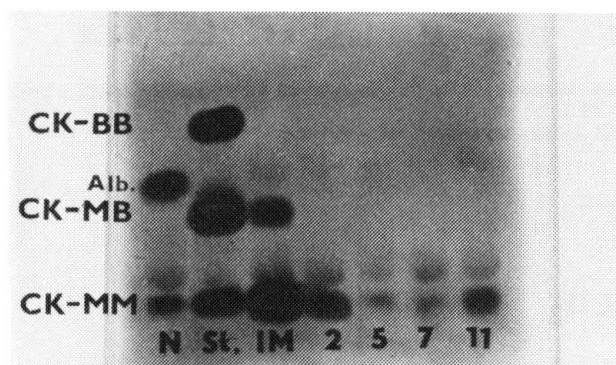
Graf 3 Průměrné hodnoty a směrované odchylky u kontrolní skupiny (KS), u skupiny nemocných I. s $CSI \leq 2,5$, II. s $CSI = 2,5 - 4,5$ a III. s $CSI \geq 4,5$
(LYS = lysozym, CK = kreatinkináza, LD = laktátdehydrogenáza, NS = bez statistické významnosti)



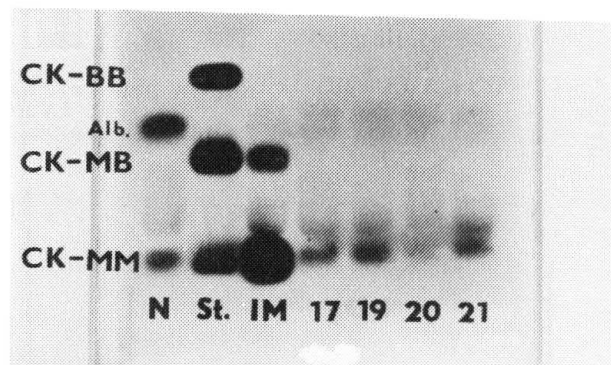
Graf 4 Průměrné hodnoty a směrované odchylky u kontrolní skupiny (KS), u skupiny nemocných I. s $CSI \leq 2,5$, II. s $CSI = 2,5 - 4,5$ a III. s $CSI \geq 4,5$
(LD₁, LD₂ a LD₃ = izoenzymy laktátdehydrogenázy, NS = bez statistické významnosti)



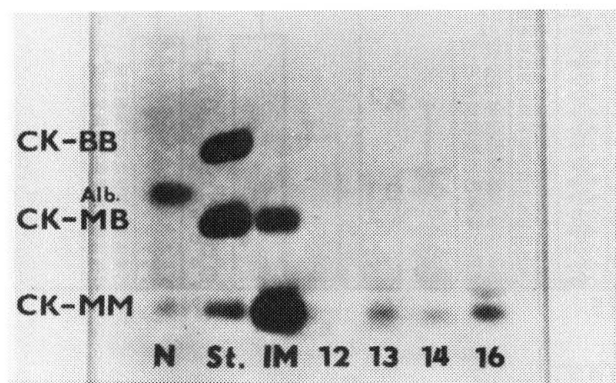
Graf 5 Průměrné hodnoty a směrované odchylky u kontrolní skupiny (KS), u skupiny nemocných I. s CSI ≤ 2,5, II. s CSI = 2,5 – 4,5 a III. s CSI ≥ 4,5 (LD₄, LD₅ = izoenzymy laktátdehydrogenázy, LD₁/LD₅ = index izoenzymů laktátdehydrogenázy)



Obr. 1 Elektroforetické rozdělení izoenzymů kreatinkinázy – CK-MM, CK-MB a CK-BB
Vysvětlivky: N = normální sérum (Alb = albumin), St. = standarda, IM = sérum nemocného infarktem myokardu a 2, 5, 7, 11 = séra nemocných kolorektálním karcinomem



Obr. 3 Elektroforetické rozdělení izoenzymů kreatinkinázy – CK-MM, CK-MB a CK-BB
Vysvětlivky: N = normální sérum (Alb = albumin), St. = standarda, IM = sérum nemocného infarktem myokardu a 17, 19, 20 a 21 = séra nemocných kolorektálním karcinomem



Obr. 2 Elektroforetické rozdělení izoenzymů kreatinkinázy – CK-MM, CK-MB a CK-BB
Vysvětlivky: N = normální sérum (Alb = albumin), St. = standarda, IM = sérum nemocného infarktem myokardu a 12, 13, 14 a 16 = séra nemocných kolorektálním karcinomem

Na obr. 1–3 jsou elektroforeticky rozdělené izoenzymy CK vždy v tomto uspořádání: kontrolní sérum, standarda, sérum nemocného akutním infarktem myokardu a séra nemocných kolorektálním karcinomem ve stadiu podle Dukese C nebo D. U těchto nemocných se nezobrazila žádná patologická frakce ani katodický mitochondriální izoenzym ani zvýšený izoenzym CK-BB.

Diskuse

V buněčné membráně jsou přítomny mnohé enzymy, které při jejím poškození jsou snadno uvolňovány do krevního řečiště. Při poškození buněk jsou

uvolňovány i enzymy z buněčných jader, z cytoplazmy nebo mitochondrií. Přítomnost nádoru může indukovat uvolnění enzymů i z okolních normálních buněk. Z těchto skutečností vychází i použití enzymů jako nádorových markerů (9). Někteří autoři (10) doporučují izoenzym CK-BB jako důležitý nespecifický nádorový ukazatel. Naše výsledky korespondují spíše s nálezy Roguljiče (8), který vyšetřoval CK a CK-BB u nemocných s různými nádory a nejnižší aktivitu našel u nemocných s maligními tumory rekta. Kanemitsu a spol. (5) našli v sérech 167 nemocných maligními tumory u 40 % mitochondriální frakci CK. Z těchto u 85 % byly metastázy. Protože je známo, že 90 % aktivity CK v epiteliálních buňkách gastrointestinálního traktu je CK-BB (2) a menší část je tvořena mitochondriální CK, pokusili jsme se zjistit použitelnost těchto izoenzymů v diagnostice kolorektálního karcinomu. Pozitivitu jsme neprokázali ani v jednom z 22 pozorování.

Giannoulaki a spol. (3) v souboru 127 nemocných malignitami prokázali zvýšení izoenzymů LD₄ a LD₅, které jsme v našem souboru nemocných kolorektálními karcinomy zjistili také. Quill a spol. (7) použili výpočtu poměru LD₅ : LD₁ a našli tento index u nemocných kolorektálním karcinomem signifikantně zvýšený. V naší práci jsme počítali index LD₁ : LD₅ (tedy obrácený index jako Quill) a potvrdili jsme, že výpočet tohoto indexu by mohl mít význam v diagnostice kolorektálního karcinomu.

Pro diagnostiku kolorektálního karcinomu jsou enzymy méně vhodné než běžně používané markery, jako CSI, CRP, CEA a kyselina sialová. Z enzymů má význam používat k těmto účelům jako doplňující vyšetření stanovení lysozymu a poměru izoenzymů LD₁ : LD₅.

Souhrn

V sérech 22 nemocných kolorektálním karcinomem a 20 dárců krve jsme sledovali tyto ukazatele: karcinoembryonální antigen, alfa-1 fetoprotein, poměr alfa-1 orozomukoidu : prealbuminu (CSI), kyselinu sialovou, C-reaktivní protein, lysozym, kreatin-

kinázu a její izoenzymy a laktátdehydrogenázu a její izoenzymy. Zkoumaný soubor jsme rozdělili do tří skupin podle CSI: 1. skupina CSI ≤ 2,5, 2. skupina CSI = 2,5 – 4,5 a 3. skupina CSI ≥ 4,5. Změny celkových aktivit CK a LD nebyly významné při srovnání s kontrolní skupinou. Při elektroforetickém dělení izoenzymů CK nebyla nalezena ani mitochondriální frakce ani zvýšení aktivity CK-BB. U izoenzymů LD byly zjištěny významné změny u LD₅ a poměru LD₁ : LD₅ oproti dárcům krve.

Literatura

1. CALDANI, C. et al.: Orosomucoid:prealbumin ratio – a marker of the host-tumor relationship in head and neck cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 24, 1988, č. 4, s. 653–657.
2. DORAN, G. R.: Appearance of creatine kinase BB isoenzymes in the serum of a patient suffering from infarction of the colon. *Clin. Chim. Acta*, 92, 1979, č. 3, s. 415–419.
3. GIANNOULAKI, E. E. et al.: Lactate dehydrogenase isoenzymes pattern in sera of patients with malignant diseases. *Clin. Chem.*, 35, 1989, č. 3, s. 396–399.
4. HENN, K. H. – GRESSNER, A. M.: Zur klinischen Wertigkeit der Sialinsäure im Serum bei benignen und malignen Erkrankungen. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 25, 1987, č. 7, s. 423–430.
5. KANEMITSU, F. et al.: Mitochondrial creatine kinase as a tumor-associated marker. *Clin. Chim. Acta*, 138, 1984, č. 2, s. 175–183.
6. MASOPIST, J.: Přínos klinické biochemie pro onkologii. *Prakt. Lék. (Praha)*, 68, 1988, č. 24, s. 919–924.
7. QUILL, D. S. et al.: Lactate dehydrogenase (LDH) isoenzymes and sialomucins in colorectal cancer. *Gut*, 25, 1984, s. A569.
8. ROGULJIČ, A. – SAFWAN, T. – ŠEPAROVÍČ, V.: Creatine kinase-BB activity in malignant tumors and in sera from patients with malignant diseases. *Tumori*, 75, 1989, č. 6, s. 537–541.
9. STEFANINI, M.: Enzymes, isoenzymes, and enzyme variants in the diagnosis of cancer. *Cancer*, 55, 1985, č. 9, s. 1931 až 1936.
10. STRÖM, S. – BENDA, R.: Serum creatine kinase isoenzymes in patients with advanced malignant disease. *Acta Med. Scand.*, 213, 1983, s. 289–294.
11. TICHÝ, M. et al.: Některé nádorové markery u kolorektálního karcinomu. *Biochem. Clin. Bohemoslov.*, 17, 1988, č. 2, s. 97–102.

Klíčová slova: Kolorektální karcinom; Enzymy; Kreatinkináza; Laktátdehydrogenáza; Lysozym; Cancer serum index.