

Ověření referenčního intervalu hodnot S100B a NSE – závislosti na věku, době odběru a pohlaví

Pikner R.¹, Lavička P.², Kormunda S.³, Topolčan O.⁴, Bosman R.⁵, Chytra I.⁵, Holubec L.⁴, Choc M.²

¹Oddělení klinických laboratoří, Klatovská nemocnice, a. s.

²Neurochirurgické oddělení FN Plzeň

³Ústav sociálního lékařství, LF UK Plzeň

⁴Oddělení nukleární medicíny, úsek imunodiagnostiky FN Plzeň

⁵Anesteziologicko-resuscitační klinika FN Plzeň

SOUHRN

Úvod a cíl: S100B protein a neuron specifická enoláza (NSE) jsou intenzivně zkoumané markery poškození CNS. Ověření referenční hodnot v séru a variability výsledků na čase odběru, pohlaví a věku jsou základní podmínky interpretace měřených hodnot.

Materiál a metoda: Referenční interval jsme ověřili na 50 dobrovolnících, z nichž 10 mělo opakované odběry po 6 a 24 hodinách. Následně jsme analyzovali vliv věku, pohlaví, doby odběru na referenční meze, která byly stanoveny jako 95% percentil referenční skupiny.

Výsledky a závěr: Zjistili jsem, že hodnoty NSE a S100B nevykazují klinicky významnou závislost na době odběru, pohlaví a věku. Hodnoty NSE mají vyšší variabilitu výsledků a cca 8 % vzorků muselo být vyloučeno z analýzy pro viditelnou hemolýzu. U S100B proteinu jsme zjistili vyšší horní referenční limit 0,2 µg/l, než je udáváný výrobcem; to však nemá zásadní klinický dopad na hodnocení výsledků.

Klíčová slova: NSE, S100B protein, referenční interval, sérum.

SUMMARY

Pikner R., Lavička P., Kormunda S., Topolčan O., Bosman R., Chytra I., Holubec L., Choc M.: Verifying of S100B and NSE reference interval – age, gender and sampling time dependence

Objective: S100B protein and neuron specific enolase (NSE) are nowadays intensively investigated as markers of central nervous system damage. Verification of reference values and result variability (biological) are basic conditions of results interpretation.

Material and Methods: Reference intervals were verified on 50 volunteers, from them 10 had done repeatedly blood sampling after 6 and 24 hours from baseline. The influence of age, sex and time of sampling on reference cut offs were than analysed. Cut-offs were established as 95% percentile of marker level in analysed group.

Results and conclusion: We found that, NSE and S100B levels do not show any clinically important dependence on the time of sampling, age and sex. NSE levels appear to have higher result variability and approximately 8% of samples had to be excluded from analysis due to visible haemolysis. We established a higher reference cut off for S100B – 0.2 µg/l, than manufacturer had set up, but it did not have any crucial effect on clinical evaluation of results.

Key words: NSE, S100B protein, reference interval, serum.

Úvod

Protein S100B a neuron specifická enoláza (NSE) jsou v současnosti intenzivně zkoumány jako markery poškození CNS. S100B má vysokou negativní prediktivní hodnotu [1, 2, 3], a proto ověření referenčního intervalu v séru je základní podmínkou interpretace.

S 100B protein patří do skupiny intracelulárních regulačních proteinů. Celá rodina S100 je skupina proteinů o nízké molekulové hmotnosti (9000–13000). Jde o Ca²⁺ vázající proteiny a tvoří podskupinu EF-hand Ca²⁺ proteinů, jejichž terciální struktura je tvořena 2 α šroubovicemi spojenými Ca²⁺ vázající kličkou z 12 aminokyselinových zbytků [4].

V současnosti bylo objeveno nejméně 20 S100 proteinů, většina z nich má geny lokalizované na chromozomu 1q21, ostatní pak na chromozomech 4p16 (S100P), 5q14 (S100Z), 21q22 (S100B) a Xp22 (S100G) (5).

Před více než 25 lety bylo prokázáno, že S100 protein není jen v mozkové tkáni [6]. U savců je hlavní podjednotkou S100B v gliálních buňkách centrálního a periferního nervového systému, chondrocytech, melanocytech a adipocytech, zatímco S100A1 je nejčastější v kardiomyocytech, slinných žlázách a v ledvinových buňkách. S100B je exprimován i v subpopulacích neuronů. Ostatní členové S100 rodiny jsou více tkáňově specifické: ledviny (S100A2), fibroblasty (S100A4, S100A6, S100A10), myoepiteliální buňky (S100A4), nádorové buňky (S100B, S100A4, S100A6), epiteliální buňky (S100A7, S100A8, S100A9, S100A10), granulocyty a monocyty (S100A8, S100A9, S100A12 a S100A8-like protein CP-10), hladké a srdeční svalové buňky (S100A2, S100A4, S100A6, S100A11), placenta (S100P) [7, 8, 9]. To znamená, že mohou mít a mají svoji zcela specifickou roli a váží se i na různé specifické molekuly. Každý ze skupiny S100B protei-

nů je klinický významný u jiného onemocnění, a to podle tkáně, kde je produkován.

Klinické využití S100B zahrnuje jak stanovení v séru, tak v mozkomíšním moku. Do současnosti byla publikována celá řada prací potvrzující význam S100B jako markeru poškození CNS (trauma, ischemie, zánětlivá onemocnění), dále u melanomu (časný marker metastatického šíření melanomu), v mozkomíšním moku jsou změněné hladiny u neurodegenerativních onemocnění (Alzheimerova nemoc, roztroušená skleróza). S100A1 je v současnosti zkoumán jako potencionální marker kardiomyopatie, akutní koronární ischemie) [10, 11, 12, 13].

Neuron-specifická enoláza (NSE) je glykolytický enzym přítomný ve tkáních neuroektodermálního původu, ve zdravém organismu především v neuronech.

Jedná se o 2-fosfo-D-glyceráthydrolázu, která je obsažena v cytoplazmě buněk ve formě dimerů tvořených podjednotkami alfa, beta a gama. V podobě homodimerů či heterodimerů se vyskytuje rovněž v tělesných tekutinách; homodimer složený ze dvou gama podjednotek je typický pro neurony. Biologický poločas je asi 48 hodin. NSE katalyzuje přeměnu 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát. Za fyziologického stavu ji produkuje nervová a plicní tkáň plodu, v dospělosti je její výskyt v normálním stavu vázán především na neurony [14, 15]. Je produkována maligními nádory neuronálního a neuroendokrinního původu (neuroblastom, melanom, malobuněčný karcinom plic), dále se zvýšené sérové hladiny nacházejí u seminomů a méně adenokarcinomů ledvin [16, 17].

Kromě maligních onemocnění neuroendokrinního původu je NSE spolu S100B markerem poškození CNS, kde zvýšené hladiny v séru jsou způsobeny destrukcí neuronů a vyplavením NSE [18, 19].

Limitací stanovení NSE je přítomnost hemolýzy vzorku, neboť NSE je obsažena ve významném množství v erythrocytech a hemolýza tedy nespecificky zvyšuje hodnoty NSE měřené v séru [20, 21].

Cílem naší studie bylo ověřit referenční interval S100B a NSE stanovené výrobcem především ve starším věkové skupině a posoudit variabilitu markeru způsobenou různou dobou odběru.

Materiál a metoda

Ověření referenčního intervalu

Ověření referenčního intervalu bylo provedeno u 50 dobrovolníků (23 mužů, a 27 žen), kteří neměli přítomné neurodegenerativní onemocnění či poškození CNS. K posouzení variability markerů jsme u 10 dobrovolníků provedli stanovení v čase „0 hodin“ (1. odběr) a za 6 a 24 hodin od prvního odběru tak, aby bylo zaručeno urychlené zpracování vzorku v laboratoři do 2 hodin od odběru. Termínem „0 hodin“ (1. odběr) je myšlen první odběr, který byl prováděn standardně nalačno mezi 7. a 9. hodinou ranní.

Hladina S100B proteinu byla stanovována pomocí komerčně dodávané luminiscenční nekompetitivní imunoanalýzy na plně automatizovaném imunoanalýzátoru Liaison (DiaSorin, Italy). Tato metoda detekuje S100B

podjednotku a jak dimery S100BB, tak i S100A1B. Výrobce udávaný analytický CV je do 5 % v oblasti referenční meze. Hladina NSE byla stanovena pomocí komerčně dodávané soupravy IRMA (nekompetitivní imunoradiometrická analýza) od firmy Immunotech (Česká republika). CV přesnosti měření udávané výrobcem jsou 7,6 % v sérii a 7,3 % mezi sériemi bez udání koncentračního rozpětí.

Statistické zhodnocení bylo provedeno statistickým softwarem „SW CRAN“. Pro dané skupiny a podskupiny byla počítána základní deskriptivní statistika. Vybrané statistické údaje byly zpracovány do *box and whisker* diagramů. Existence dolního referenčního limitu není fyziologicky možná, proto byla jako referenční mez ustanovena hodnota 95. percentilu. Detailní analýza rozdílů distribucí byla provedena ANOVA (ANALYSIS OF VARIANCE) neparametrickým testem.

Výsledky

Analýzovali jsme odběry celkem u 50 pacientů průměrného věku 54,5 roku (SD 16,64, minimum 18, medián 57, maximum 84 let). Deset z nich mělo provedeno opakované odběry. Ve skupině NSE bylo celkem vyhodnoceno 46 odběrů, 4 (8 %) byly pro viditelnou hemolýzu vzorku nezpracovávány. V tabulce 1 je souhrn základních statistických parametrů.

Table 1. Basic statistical description – normal values group

Marker	No	Mean	SD	Minima	Maxima	Median	Units
S100_0h	50	0.11	0.039	0.03	0.21	0.10	µg/l
NSE_0h	46	5.7	2.57	6.6	17.9	5.2	µg/l
S100_6h	0	0.11	0.040	0.06	0.19	0.10	µg/l
NSE_6h	9	4.6	1.46	3.1	7.9	4.0	µg/l
S100_24h	10	0.11	0.044	0.06	0.19	0.10	µg/l
NSE_24h	10	5.7	5.30	3.0	20.1	3.7	µg/l

Interindividuální variabilita byla vypočítána jako CV průměru hodnot v čase „0 hodin“ a činila u S100B CV = 36,6 %; průměr 0,11 µg/l (n = 50), a u NSE CV = 45,5 %; průměr 5,7 µg/l (n = 46).

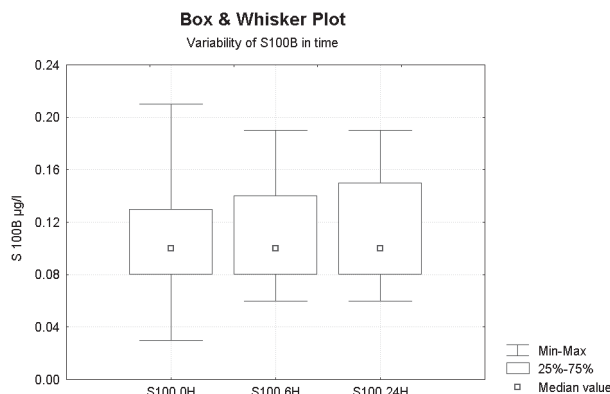


Fig. 1. Variability of S100B according to sampling time

Analýza rozdílů distribucí podle času odběru – intraindividuální variabilita: U S100B jsme nenalezli statisticky významnou změnu v hladinách markeru podle času odběru ($p = 0,08866$) a medián CV byl 1,9 % (graf. 1). Ani u NSE jsme nenalezli statisticky významnou změnu v hladinách markeru podle času odběru ($p = 0,3368$) a medián CV byl 5,5 % (graf 2).

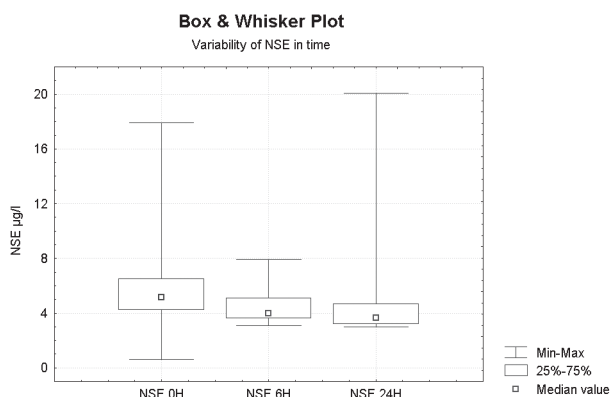


Fig. 2. Variability of NSE according to sampling time

Referenční meze

Bez ohledu na věk jsme stanovili referenční mez pro S100B na 0,19 µg/l a pro NSE 8,9 µg/l. Při analýze závislosti referenčního intervalu S100B a NSE na věku probanda jsme sice našli statisticky významný rozdíl mezi hodnotami S100B do 65 let a nad 65 let, které jsou vyšší (neparametrická ANOVA, $p < 0,017$), ale Spearmanova pořadová korelace s věkem byla nevýznamná ($p < 0,323$) – graf 3. Tento rozdíl proto v našem souboru nehodnotíme jako statisticky významný.

Pro probandy mladší 65 let je zjištěná referenční mez 0,19 µg/l (95. percentil, $n = 37$) a u probandů starších 65 let 0,21 µg/l (95. percentil, $n = 13$). U NSE jsme závislost na věku neprokázali. Rovněž jsme neprokázali statisticky významnou závislost hodnot NSE a S100B na pohlaví.

Vezmeme-li úvahu analytickou přesnost metody a výhodnost snadnějšího zapamatování jednoduché referenční meze, definovali jsme jako referenční mez 0,20 µg/l (průměr obou mezí) pro S100B a 9 µg/l pro NSE.



Fig. 3. Age differences in S100B (below 65 and above 65 years of age)

Diskuse

Ve vyšetřené skupině dobrovolníků jsme u NSE vyloučili z hodnocení 8 % odběrů z důvodů viditelné hemolýzy. Pouze jeden dobrovolník měl vyšší hodnotu, než odpovídá výrobcem udávaná referenční mez (13,4 µg/l). Neprokázali jsme závislost na době odběru ani u jednoho z parametrů, což je v souladu s jinými autory. NSE má však vyšší inter- i intraindividuální variabilitu. Zde však nelze vyloučit i vliv minimální neviditelné hemolýzy vzorku. Pak by nezbývalo, než vždy současně stanovit volný hemoglobin a k němu vztahovat stanovení NSE [22]. Hemolýza je poměrně závažným problémem při stanovení NSE, především u pacientů na jednotce intenzivní péče. Jedná se hlavně o intravazální hemolýzu po podání krevních derivátů, kterou nejsme odběrem a časným transportem schopni ovlivnit [21, 23, 24].

Stanovená referenční mez NSE odpovídá hodnotám uváděným v ostatních publikacích a v souladu s většinou autorů jsme nenalezli rozdíly podle věku a pohlaví [25, 26], to rovněž odpovídá i údajům výrobce. Námi zjištěná mez je nižší než udávaná výrobcem, což se domníváme bylo zřejmě vyloučením jakýchkoliv viditelně hemolytických vzorků.

U hladiny S100B je výrobcem udávaná referenční mez pro S100B 0,15 µg/l bez ohledu na pohlaví a věk. Námi stanovená mez pro S100B je vyšší než udávaná normál, tento fakt může být vysvětlen vyšším podílem starších probandů (výrobce neudává věkové složení ani počet probandů), protože ve studiích dalších autorů byli většinou mladší probandi. Nelze vyloučit i vliv rasy (švédská populace u výrobce) [25, 27]. Námi prokázané rozdíly v S100B proteinu podle věku jsou zřejmě chybou malých čísel. Rozdíly jsou natolik minimální, že nemají klinický dopad na interpretaci. Námi zvolená hodnota 0,2 µg/l jako referenční bez ohledu na pohlaví a věk se jeví jako možný vhodný dobře zapamatovatelný kompromis zohledňující i analytickou přesnost metody. Tato hladina odpovídá i klinicky. Sledovali jsme skupinu pacientů s izolovaným traumatem CNS ($n = 98$). Pacienti, kterým se normalizovala hodnota S100B pod 0,2 µg/l do 24 hodin, měli 87,5% pravděpodobnost dobrého výsledného klinického stavu při propuštění (hodnoceno podle Gleason Outcome Scale). U těch pacientů, u nichž došlo k normalizaci hodnot S100B až po 72 hodinách byla pravděpodobnost dobrého výsledného klinického stavu 92% [28].

Rozhodovací mez nelze hodnotit jako jednoznačnou diferenciací linii, neboť s nárůstem hodnot S100B kontinuálně narůstá i riziko přítomnosti choroby. Na druhé straně časný pokles hodnot S100B k normálu znamená s vysokou pravděpodobností dobrou prognózu pro pacienta s traumatickým poškozením CNS.

Závěry

Referenční intervaly S100B a NSE nevykazují klinicky významné rozdíly z hlediska pohlaví, věku a době odběru vzorku.

Jako referenční mez pro S100B jsme stanovili hodnotu 0,2 µg/l a pro NSE 9 µg/l.

Vzhledem k hemolýze a větší variabilitě NSE se jako analyticky vhodnější parametr jeví S100B, a to v aplikaci jako marker poškození CNS.

Literatura

1. **Woertgen, C., Rothoerl, R. D., Brawanski, A.** Early S-100B serum level correlates to quality of life in patients after severe head injury. *Brain Injury*, 2002, 16, p. 807–816.
2. **Biberthaler, P., Mussack, T., Wiedemann, E., Kanz, K. G., Koelch, M., Gipper-Steppert, C. et al.** Evaluation of S100b as a specific marker for neuronal damage due to minor head trauma. *World J. Surg.*, 2001, 25, p. 93–97.
3. **Townend, W. J., Guy, M. J., Pani, M. A., Martin, B., Yates, D. W.** Head injury outcome prediction in the emergency department: a role for protein S100B. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2002, 73, p. 542–546.
4. **Schäfer, B. W., Heizmann, C. W.** The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem. Sci.*, 1996, 21, p. 134–140.
5. **Marenhol, I., Heizmann, C., Fritz, G.** S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature) *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular Cell Research*, 1999, 1450, 3, p. 191–231.
6. **Cocchia, D., Michetti, F., Donato, R.** S100 antigen in normal human skin. *Nature*, 1981, 294, p. 85–87.
7. **Santamaria-Kisiel, L., Rintala-Dempsey et al.** Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem. J.*, 2006, 396, p. 201–214.
8. **Zimmer, D. B., Cornwall, E. H., Landar, A., Song, W.** The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res. Bull.*, 1995, 37, p. 417–429.
9. **Schäfer, B. W., Heizmann, C. W.** The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem. Sci.*, 1996, 21, p. 134–140.
10. **Isobe, T., Takahashi, K., Okuyama, T.** S100 α ($\alpha\alpha$) protein is present in neurons of the central and peripheral nervous system. *J. Neurochem.*, 1984, 43, p. 1494–1496.
11. **Rickmann, M., Wolff, J. R.** S100 protein expression in a subpopulation of neurons of rat brain. *Neuroscience*, 1995, 67, p. 977–991.
12. **Schäfer, B. W., Heizmann, C. W.** Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors. *Int. J. Cancer*, 1996, 68, p. 325–332.
13. **Maelandsmo, G. M., Florenes, V. A., Mellingsaeter, T. et al.** Differential expression patterns of S100A2, S100A4 and S100A6 during progression of human malignant melanoma. *Int. J. Cancer*, 1997, 74, p. 464–469.
14. **Kaiser, E., Kuzmits, R., Pregant, P. et al.** Clinical biochemistry of neuron specific enolase. *Clin. Chim. Acta*, 1989, 183, p. 13–31.
15. **Cooper, E. H.** Neuron-specific enolase. *Int. J. Biol. Markers*, 1994, 9, p. 205–210.
16. **Jorgensen, L. G., Osterlind, K., Hansen, H., Cooper, E.** Serum Neuron specific enolase (S-NSE) in progressive small-cell lung cancer (SCLC). *Br. J. Cancer*, 1994, 70, p. 759–761.
17. **Cunningham, R., Johnston, C., Irvine, G., Buchanan, K.** Serum neuron specific enolase levels in patients with neuroendocrine and carcinoid tumours. *Clin. Chim. Acta*, 1992, 212, p. 123–131.
18. **Ondrkalová, M., Kalnovičová, T., Štofko, J., Traubner, P., Turčáni, P.** Hladina neuron-špecifickéj enolázy při ložiskovej ischémii mozgu. *Klin. Biochem. Metab.*, 2006, 14, 35, 4, p. 202–206.
19. **Naeimi, Z. S., Weinhofer, A., Sarahrudi, K., Heinz, T., Vecsei, V.** Predictive value of S-100B protein and neuron specific-enolase as markers of traumatic brain damage in clinical use. *Brain Inj.*, 2006, 20, 5, p. 463–468.
20. **Gao, F., Harris, D., Sapsed-Byrne, S., Sharp, S.** Neuron-specific enolase and Sangtec 100 assays during cardiac surgery: Part III – Dose haemolysis affect their accuracy? *Perfusion*, 1997, 12, 3, p. 171–177.
21. **Marangos, P., Campbell, I., Schmechel, D., Murphy, D., Godwin, F.** Blood Platelets Contain a Neuron-Specific Enolase Subunit. *Journal of Neurochemistry*, 1980, 34, 5, p. 1254–1258.
22. **Nekulová, M., Šimíčková, M.** Interpretace hodnot nádorového markeru NSE (neuron specifická enoláza) ve vztahu k volnému hemoglobinu v séru. *Provozní dokumenty – Masarykův onkologický ústav, oddělení laboratorní medicíny*.
23. **Johnsson, P., Blomquist, S., Luhrs, C., Malmkvist, G., Alling, C., Solem, J. O., Stahl, E.** Neuron-specific enolase increases in plasma during and immediately after extracorporeal circulation. *Ann. Thorac. Surg.*, 2000, 69, 3, p. 750–754.
24. **Pelinka, L. E., Hertz, H., Mauritz, W., Harada, N., Jafarmadar, M., Albrecht, M., Redl, H., Bahrami, S.** Nonspecific increase of systemic neuron-specific enolase after trauma: clinical and experimental findings. *Shock*, 2005, 24, 2, p. 119–123.
25. **Van Engelen, B. G., Lamers, K. J., Gabreels, F. J., Wevers, R. A., van Geel, W. J., Borm, G. F.** Age-related changes of neuron-specific enolase, S-100 protein, and myelin basic protein concentrations in cerebrospinal fluid. *Clin. Chem.*, 1992, 38, p. 813–816.
26. **Casmiro, M., Maitan, S., De Pasquale, F., Cova, V., Scarpa, E., Vignatella, D.** Cerebrospinal fluid and serum neuron-specific enolase concentrations in a normal population. *European Journal of Neurology*, 2005, 12, p. 369–374.
27. **de Kruijk, J. R., Leffers, P., Menheere, P. P. C. A., Meerhoff, S., Twijnstra, A.** S-100B and neuron-specific enolase in serum of mild traumatic brain injury patients. A comparison with healthy controls. *Acta Neurol. Scand.*, 2001, 103, p. 175–179.
28. **Lavička, P., Pikner, R., Kormunda, S., Topolčan, O., Bosman, R., Chytra, I., Holubec, L., Choc, M.** Význam stanovení S100B proteinu u pacientů s izolovaným poraněním hlavy. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie (v tisku)*.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR MR 7874-3/2004.

Do redakce došlo 26. 2. 2007.

Adresa pro korespondenci:
MUDr. Richard Pikner
Oddělení klinických laboratoří
Klatovská nemocnice, a. s.
Plzeňská 569
339 38 Klatovy
e-mail: pikner@nemkt.cz