

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra biologických a lékařských věd

Imunochemická stanovení nádorových markerů

(bakalářská práce)

Vedoucí práce: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Školitel specialista: MUDr. Jaromír Pavka

Hradec Králové, 2008

Jarmila Mitřengová

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně. Veškerá literatura a zdroje, které jsem při zpracování použila, jsou uvedené v seznamu literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové, dne 21.4. 2008

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu práce PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. za odborné vedení a rovněž děkuji MUDr. Jaromíru Pavkovi za cenné rady a pomoc při zpracování práce. Dále chci poděkovat své rodině a přátelům za podporu a zázemí pro práci a studium.

OBSAH

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | ÚVOD | 5 |
| 2 | CÍL | 6 |
| 3 | LITERÁRNÍ PŘEHLED | 7 |
| 3.1 | Nádorová onemocnění | 7 |
| 3.1.1 | Definice nádorového onemocnění..... | 7 |
| 3.1.2 | Příčiny a genetická podstata vzniku nádorové transformace | 8 |
| 3.1.3 | Protoonkogeny a onkogeny | 9 |
| 3.1.4 | Antionkogeny | 10 |
| 3.1.5 | Telomery | 11 |
| 3.1.6 | Vztah infekce k nádorovému bujení | 11 |
| 3.1.7 | Nádorové antigeny | 12 |
| 3.2 | Nádorové markery..... | 13 |
| 3.2.1 | Definice a povaha nádorových markerů..... | 13 |
| 3.2.2 | Klasifikace nádorových markerů | 14 |
| 3.2.3 | Předpoklady využití stanovení nádorových markerů | 15 |
| 3.2.4 | Praktické využití nádorových markerů v klinické praxi | 19 |
| 3.2.5 | Kvalita stanovení nádorových markerů | 20 |
| 3.2.6 | Laboratorní diagnostika u nádorových onemocnění..... | 22 |
| 3.2.7 | Jednotlivé nádorové markery | 23 |
| 3.3 | Laboratorní stanovení nádorových markerů..... | 34 |
| 3.3.1 | Imunochemické reakce | 34 |
| 3.3.2 | Techniky imunoanalýz..... | 37 |
| 3.3.3 | Příklady technologií používaných v dnešní době | 41 |
| 3.3.4 | Laboratorní metoda a její analytické vlastnosti..... | 47 |
| 4 | ZÁVĚR..... | 54 |
| 5 | SOUHRN | 56 |
| 6 | SEZNAM ZKRATEK | 57 |
| 7 | SEZNAM LITERATURY..... | 60 |

1 ÚVOD

Nádorové onemocnění (rakovina) představuje pro pacienty, jejich rodiny a společnost onemocnění nahánějící děsivý strach. Je jednou z hlavních příčin úmrtí. V roce 2005 zemřelo ve světě 7,6 miliónů lidí na nádorová onemocnění. Z toho více než 70% úmrtí připadlo na málo rozvinuté země s omezenými nebo neexistujícími zdroji pro prevenci, diagnózu a léčbu. Výhledově zemře na rakovinu v roce 2015 9 miliónů a v roce 2030 11,4 miliónů lidí (Anonym 1, 2008). Mnohým z nádorových onemocnění může být zabráněno prevencí (okolo 40%). Jiná mohou být rozpoznána včas, léčena a vyléčena (Anonym 2, 2008).

Danaei a kol. (2005) rozdělují prevencí ovlivnitelné faktory na 9 hlavních rizikových faktorů. Jsou to kouření (21%), alkohol (5%), nízká konzumace ovoce a zeleniny (5%), nebezpečný sex (3%), nedostatek fyzické aktivity (2%), infekce v zařízeních zdravotní péče (2%), nadváha a obezita (2%), znečištění městského vzduchu (1%) a domácí znečištění z použití pevných paliv (0,5%).

Zhoubné nádory jsou v ČR po onemocněních oběhové soustavy druhou nejčastější příčinou úmrtí v lidské populaci. Úmrtnost zapříčiněná zhoubnými nádory je typická pro osoby ve věku 45-64 let. Na celkovém počtu úmrtí dosahuje maximálního podílu ve věkové skupině 55-69 let. Dlouhodobě podíl zemřelých na zhoubné nádory v ČR roste. V roce 1990 představovaly 21,8% příčin všech úmrtí, v roce 2000 26,2% a v roce 2006 již 26,7% (Anonym 3, 2008).

Prognóza celosvětového vývoje onemocnění rakovinou je pesimistická (Anonym 1, 2008). Mezi faktory, které mohou ovlivnit tento předpokládaný nepříznivý vývoj patří změna životního stylu a zlepšená diagnostika nádorových onemocnění (Nekulová a kol., 2006). Obrovský rozvoj přístrojové a výpočetní techniky v poslední době umožňuje současně rozvoj analytických metod, zvyšování citlivosti, spolehlivosti a rychlosti stanovení laboratorních ukazatelů, což ve svém důsledku vede ke zkvalitnění péče o onkologické pacienty (Racek a kol., 2006).

2 CÍL

Cílem práce je zpracovat v literární rešerši souhrnný přehled nádorových markerů používaných v klinické praxi se speciálním zaměřením na jejich detekci imunochemickými metodami. Jako dílčí cíle jsme si vytýčili zpracovat:

- definice a příčiny vzniku nádorového onemocnění,
- předpoklady pro praktické využití stanovení nádorových markerů,
- nádorové markery v klinické praxi,
- přehled a charakteristiky jednotlivých nádorových markerů,
- stanovení nádorových markerů imunochemickými metodami.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 *Nádorová onemocnění*

3.1.1 Definice nádorového onemocnění

V současné době je nádorové bujení definováno jako proces závažného narušení vzájemných vztahů mezi buňkami, který vede v buňce ke kumulaci genetických poruch, k aktivaci protoonkogenů a inaktivaci antionkogenů. Nádorové buňky lze vnímat jako populaci, jenž se vymyká z kontroly mezibuněčné signální sítě tvořenou cytokiny a membránovými interakcemi. Výsledkem je morfolo- gická a funkční přeměna, narušení architektury zdravé tkáně a nakonec meta- statická aktivita vzniklé populace nádorových buněk (Krejsek a Kopecký, 2004).

Nádor (tumor, neoplazma, novotvar) je patologický útvar vzniklý v mnoho- buněčném organismu a způsobuje závažné onemocnění zvané rakovina. Vyso- ká míra individuality a rozmanitosti představuje velké komplikace v diagnostice i terapii nádorů (Šmarda a Šmardová, 2007).

Nádorové onemocnění je patologický stav, který se týká celého organismu a nepředstavuje pouze změny v genetickém vybavení a průběhu buněčného cyk- lu určité buňky. Proces kancerogeneze je složený ze sledu událostí, který se může zastavit na samém počátku, nebo v určité fázi, také může vyústit v ne- zhoubné onemocnění. Klinické projevy a průběh nemoci závisí na stavu celého organismu a na okolních podmínkách (Masopust, 1998).

Kancerogeneze, proces vzniku a vývoje nádorů, je proces vícestupňový, během kterého dochází k hromadění mutací v postižených buňkách a tímto po- skytují mutantním buňkám výhodu v boji o přežití se sousedními buňkami (Šmarda a Šmardová, 2007).

Proces kancerogeneze zahrnuje tři hlavní fáze:

Stadium **iniciace** – tj. mutace určitého genu. Představuje období krátké, ale nevrátne, při němž buňky získávají růstovou selekční výhodu a schopnost pře- měnit se na buňky nádorové .

Stadium **promoce** – proliferace postiženého buněčného klonu je dále podporována promočními faktory, při jejichž odstranění se může kancerogeneze zastavit nebo zpomalit.

Stadium **progrese** – dochází k další postupné kumulaci genetických a epigenetických změn, probíhá invaze nádoru do blízkého okolí a krevní cestou se šíří na vzdálená místa. Vznikají metastázy a konečné stadium vlastního nádorového onemocnění jako klinické formy (Masopust, 2004a).

3.1.2 Příčiny a genetická podstata vzniku nádorové transformace

K poškození genomu dochází chybami ve struktuře a funkci DNA a chybami enzymatické výbavy (Krejsek a Kopecký, 2004). Proces vzniku nádorového onemocnění může být velice individuální. Společným rysem pro vytvoření maligního fenotypu je odhadována kumulace 4 až 8 genetických změn v postižené buňce. Mutace nastávají většinou v protoonkogenech a nádorových supresorech (Šmarda a Šmardová, 2007).

Poškození DNA mohou způsobit faktory endogenní, tj. vrozené genetické poruchy, i faktory exogenní fyzikální nebo chemické povahy s genotoxickým účinkem, např. ionizující záření, UV záření, chemické sloučeniny obsažené v tabákovém kouři, v pracovním prostředí, v potravě, a také potravní zvyklosti lidí. Významnou roli ve vzniku nádorového bujení představují i infekční procesy. Mezi endogenní příčiny vedoucí k poškození DNA patří také látky vznikající během buněčného metabolismu. Příkladem jsou vysoce reaktivní kyslíkové mediátory, které vznikají při oxidační respiraci a peroxidaci během metabolismu lipidů. Tyto látky zabraňují detoxikačnímu účinku antioxidantních enzymatických systémů, které představují superoxidová dismutáza, kataláza, glutathionperoxidáza (Krejsek a Kopecký, 2004).

Negativní účinek kyslíkových radikálů, UV a ionizujícího záření, aromatických uhlovodíků a dalších kancerogenních látek se projevuje poruchami struktury makromolekuly DNA. Dochází k hydrolýze nukleotidů, k deaminaci, k přerušení řetězce, ke zlomům obou vláken, k tvorbě thymidinových dimerů. U takto poškozené DNA je blokována transkripce, během replikace dochází k delecím, translokacím, amplifikacím, inzercím a ke hromadění genetických poruch v ge-

nomu buňky, jenž vedou k rozvoji nádorového bujení. Reparační mechanismy jsou schopny do jisté míry genetická poškození DNA v organismu odstraňovat. Poruchy těchto opravných mechanismů vedou také ke vzniku geneticky podmíněných nádorů (Krejsek a Kopecký, 2004).

Kancerogeneze je několikastupňový proces podmíněný faktory genetickými i environmentálními. Podle rizika vzniku maligního onemocnění je populace rozdělována na čtyři skupiny, tzv. onkodémy:

základní – riziko vzniká nahromaděním bodových mutací

environmentální – riziko stoupá s účinkem okolních podmínek (chemické látky, záření, viry)

environmentálně genetická – populace s vyšší náchylností ke kancerogenům

genetická – riziko geneticky přenosné (Masopust, 1998).

Rakovina je ve většině případů způsobena mutacemi somatickými, které se objevují v buňkách dospělého člověka. Nahromadění většího množství somatických mutací probíhá v průběhu až několika let. Nádorovým onemocněním jsou proto postiženi častěji lidé staršího věku. Vrozená zárodečná mutace způsobuje v postižených rodinách výskyt nádorů s vyšší frekvencí a také v mladším věku (Alberts a kol., 1998).

3.1.3 Protoonkogeny a onkogeny

V genetické výbavě normální zdravé buňky jsou obsaženy velmi důležité geny, označované jako protoonkogeny, které kódují proteiny podílející se na přenosu růstových a diferenciacních signálů do cytoplasmy a jádra buňky. Tyto bílkoviny urychlují buněčný cyklus a diferenciaci buňky, kontrolují expresi genů, metabolické pochody a podporují tak buněčnou proliferaci a růst tkání. Jako onkogeny jsou označovány abnormální buněčné geny, které mohou vzniknout přeměnou buněčných protoonkogenů, a jejichž bílkovinné produkty mohou přispívat k maligní transformaci buňky (Krejsek a Kopecký, 2004). Mutace protoonkogenu na onkogen souvisí s jeho hyperaktivací. Přílišná funkce vede k nadměrné proliferaci buněk (Šmarda a Šmardová, 2007). Mezi mechanismy způsobující přeměnu protoonkogenů na onkogeny patří inserce retrovirů, mutace, genová amplifikace a translokace do jiné části genomu. Postižení protoon-

kogenů, které kódují růstové faktory buňky, vede k intenzivní buněčné proliferaci a ke zvyšování pravděpodobnosti vzniku genetické chyby (Krejsek a Kopecký, 2004).

Produkty onkogenů, kterými jsou růstové faktory, receptory růstových faktorů, proteinové intracelulární kinázy, transkripční faktory, transdukční proteiny, zasahují do přenosu signálů v buňce i mezi buňkami, a tím i do kontroly růstu, dělení a diferenciaci buněk (Masopust, 1998).

Mutace v genech ras jsou přítomny až u 30% případů nádorového onemocnění u lidí (Alberts a kol., 1998). Byla prokázána souvislost mezi přítomností mutovaných genů BRCA-1, BRCA-2, TP 53 a PTEN a rizikem vzniku hereditárních forem karcinomu prsu a vaječníků v 5-10% případů. Naopak ale u 15-20% těchto nádorů nebyly prokázány známé mutace. Gen APC představuje vysoké riziko vzniku nepolymatózního kolorektálního karcinomu. Vyšetření K-Ras, p53 a dalších jsou využívána při posuzování rizika vzniku a prognózy kolorektálního karcinomu. Horší prognózu neuroblastomu signalizuje onkogen c-myc. Novým poznatkem je až 6krát větší pravděpodobnost vzniku karcinomu prostaty při mutaci v genu pro paraoxonázu (Masopust, 2004b).

3.1.4 Antionkogeny

Jako antionkogeny (tumor-supresorové geny) jsou označovány geny, jejichž bílkovinné produkty jsou součástí kontrolních mechanismů diferenciaci a růstu buňky. Jejich hlavní význam spočívá v zablokování dělení a umožnění reparací v buňce, ve které vznikly abnormální onkogeny, nebo ve spuštění apoptózy při poškození buňky většího rozsahu. Inaktivace nebo ztráta funkce antionkogenů představuje další nezbytnou podmínku vzniku nádorové transformace (Krejsek a Kopecký, 2004).

Apoptóza představuje aktivně řízený sebedestrukční proces a plní funkci ochranné bariéry proti vzniku nádorového bujení. Nádorové buňky si zajišťují tvorbu vlastních proliferčních, tzv. mitogenních signálů, a zároveň ztrácejí citlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus. Rezistence ke spuštění programované smrti buňky je rysem většiny typů nádorů (Šmarda a Šmardová, 2007). Nádorové buňky mají schopnost blokovat syntézu proapoptózních molekul, které jsou ve zvýšené míře produkovány poškozenou buňkou, a také se vyznačují

schopností poskytovat podporu antiapoptóзовým molekulám (Masopust, 2004c).

Tumor-supresorovým genem je např. Rb-gen. Protein Retinoblastoma (Rb) byl poprvé identifikován u vzácných očních nádorů dětí, kde protein Rb chybí nebo je defektní. Inaktivace obou kopií Rb-genu vysoce zvyšuje pravděpodobnost nádorové transformace např. v sítnici (Alberts a kol., 1998).

Nejvýznamnější antionkogen je p53. Jeho hlavní úloha spočívá v kontrole buněčného cyklu a v inhibici mezi fázemi G1 a S , popř. v indukci apoptózy při poškození DNA. Protein p53 má schopnost vazby na DNA, rozpoznání poškozené části a taktéž schopnost ovlivnění reparační. Je-li porucha rozsáhlá, je prostřednictvím proteinu p53 zvyšována hladina proteinu p21^{cip} , který blokuje cyklin dependentní kinázy a tím i buněčný cyklus před S fází (Krejsek a Kopecný, 2004).

3.1.5 Telomery

Omezený replikační potenciál souvisí s funkcí repetitivních sekvencí DNA na koncích chromozomů přítomných v eukaryotických buňkách, tzv. telomer. Telomery představují ochranu konců chromozomů před degradací, vzájemnou fúzí a vnímání zlomů DNA. V průběhu buněčného dělení a replikace DNA nejsou však syntetizovány plně konce dvoušroubovice DNA a telomery jsou zkracovány. Tento jev doprovází stárnutí buněk až zastavení buněčného cyklu a takto telomery určují proliferační kapacitu buněk. Kompletní replikaci konců chromozomů zajišťuje aktivní enzym telomeráza, která však ve většině lidských somatických buněk není aktivní. Naopak u většiny buněk maligních nádorů (85 až 90%) je telomeráza aktivována. Délka telomer v nádorově transformovaných buňkách je tímto udržována a dodává jim neomezený replikační potenciál (Šmarda a Šmardová, 2007). Telomeráza je proto nádorovým markerem. Příkladem je stanovení tohoto enzymu v moči u papilárního karcinomu močového měchýře (Masopust, 2004c).

3.1.6 Vztah infekce k nádorovému bujení

Infekční agens spolu s dalšími faktory může v důsledku vést ke vzniku nádorového procesu. Přínými mechanismy může být inzerce virových onkogenů do genomu hostitele, inhibice antionkogenů, stimulace proliferace buněk, nebo in-

terference s apoptózou. Další mechanismus představuje neschopnost imunitního systému člověka zničit infekční agens. Vznikají tak chronické zánětlivé reakce, jejichž produkty mohou nepříznivě ovlivnit funkce enzymů, nebo přímo poškodit DNA.

Rozsáhlou skupinou virů podmiňující rozvoj onkogeneze, je čeleď Herpes virů, především virus EBV (Epstein-Barrové) a virus HHV-8 (Kaposi Sarcoma-associated Herpes Virus), dále lidské papilomaviry, virus hepatitidy B (HBV), virus hepatitidy C (HCV), ze skupiny retrovirů HTLV-1 (Human Thymus-derived-cell Leukemia/Lymphoma Virus-1) a HIV (Human Immunodeficiency Virus), nebo bakteriální infekce *Helicobacter pylori*. Mezi neinfekční příčiny patří chronické ezofagitidy, zánětlivé reakce střevní, malé pánve, apod. (Krejsek a Kopecký, 2004).

Problémem protinádorové imunitní odpovědi je imunodominance. Její podstata spočívá ve skutečnosti, že přestože nádorově transformovaná buňka exprimuje současně celou řadu epitopů jako cílové struktury imunitní odpovědi, je imunitní systém schopen odpovědi pouze proti jedné nebo několika málo antigením strukturám. Důsledkem imunodominance je selekce a progresse klonů unikajících protinádorové imunitní reakci (Hatina, 2005).

3.1.7 Nádorové antigeny

Nádorové buňky exprimují struktury, které byly charakterizovány a popsány na molekulární úrovni až v 90. letech. Nádorové antigeny jsou podle popisu a zdroje klasifikovány do dvou kategorií (Hatina, 2005; Říhová, 2007):

- tumor-asociované antigeny (TAA),
- tumor-specifické antigeny (TSA).

TAA představují normální buněčné proteiny exprimované ve vyšší míře u nádorů určitého typu. Jsou to tzv. liniově-specifické, neboli diferenciační antigeny, specifické pro buňky, které podlely maligní transformaci, a příbuzné onkofetální antigeny, které jsou fyziologicky přítomné v průběhu embryonálního a fetálního vývoje.

TSA jsou úzce spojeny s karcinogenezí a jsou exprimovány pouze na nádorových buňkách, např. onkogeny, tumor-supresorové geny (Hatina, 2005).

Krejsek a Kopecký (2004) dělí nádorové antigeny do tří skupin:

nádorové testikulární antigeny, které jsou ve zdravém organismu vyjádřeny pouze na spermatogoniích. Antigeny této rodiny jsou exprimovány asi u 45% případů melanomu, u 30% karcinomu prsu a 25% karcinomu prostaty a ovaria.

diferenciační antigeny

nádorově specifické antigeny, které jsou produkovány pouze konkrétními typy nádorů.

3.2 Nádorové markery

3.2.1 Definice a povaha nádorových markerů

Nádorové buňky přímo syntetizují látky, které jsou definovány jako nádorové markery, nebo produkce těchto látek normálními buňkami je vyvolána přítomností nádorových buněk. Nádorové markery mohou být přítomny na povrchu buněk, v cytoplasmě, nebo buněčném jádře. Identifikace nádorových markerů se provádí v tělních tekutinách, nejčastěji v plazmě, a jejich průkaz a hladina může ukazovat na přítomnost klonů nádorových buněk (Krejsek a Kopecký, 2004). Nádorové markery jsou molekuly většinou proteinové povahy. Celulární nádorové markery se vyskytují ve tkáni maligního nádoru, v tělních tekutinách mohou být přítomny tzv. humorální nádorové markery. Do tělních tekutin přecházejí z místa, kde jsou produkovány, tj. z nádorové tkáně. Indukované nádorové markery, např. bílkoviny akutní fáze, jsou syntetizovány jinými tkáněmi v důsledku přítomnosti nádoru. Hladina nádorových markerů v krvi obvykle přímo souvisí s typem a rozsahem nádorového onemocnění (Nekulová a spol., 2006). Nádorové markery představují velice různorodé látky asociované s maligním procesem, nejčastěji proteiny, glykoproteiny, glykolipidy, muciny, látky s enzymovou aktivitou, a vypovídají o vlastnostech a chování nádoru (Klener a kol., 2002). Nádorové markery jsou laboratorní ukazatele poukazující na přítomnost maligního novotvaru (Racek a kol., 2006).

3.2.2 Klasifikace nádorových markerů

Humorální nádorové markery:

- S nádorem asociované antigeny onkofetálního typu - diferenciační:

CEA (karcinoembryonální antigen), AFP (α -1-fetoprotein), PSA (prostatický specifický antigen), antigeny CA-typu (carbohydrate antigen) (CA 15-3, CA 72-4, CA 19-9, CA 125, CA 50, CA 549, CA 242, CA 195, CAM 26, CAM 29), MCA (antigen mucinózních karcinomů), CYFRA 21-1 (fragment cytokeratinu 19), SCC (antigen skvamózních buněk), MSA (mammární sérový antigen), CA-SA (s nádorem asociovaný sérový antigen), TATI (s tumorem asociovaný trypsin-inhibitor), SP1 (beta₁-specifický glykoprotein)

- S nádorem asociované antigeny onkofetálního typu - proliferační:

TPA/TPS (tkáňový polypeptidový antigen / specifický)

- Enzymy:

NSE (neuron-specifická enoláza), TK (tymidinkináza), PAP (ACP-P prostatická frakce kyselé fosfatázy), LD (laktátdehydrogenáza)

- Hormony:

HCG (lidský choriogonadotropin), TG (tyreoglobulin), CT (kalcitonin), PRL (prolaktin), GH (růstový hormon), PTH (parathormon), ADH (antidiuretický hormon), ACTH (adrenokortikotropní hormon).

- Sérové proteiny:

FER (ferritin), B₂M (β ₂-mikroglobulin), RAF (reaktanty akutní fáze), CIC (cirkulující imunokomplexy), monoklonální imunoglobuliny

- Další metabolity:

VMK (kyselina vanilmandlová), HIOK (kyselina hydroxyindoloctová), MEL (melanogeny), polyaminy, UGP (močový gonadotropinový peptid), NMP-22 (proteiny nukleární matrix), S-100 (protein S-100), LASA (lipidově vázaná sialová kyselina).

Buněčné nádorové markery:

steroidní receptory, receptory růstových faktorů, katepsin D, onkoproteiny (Nekulová a Šimíčková, 2000).

Podle Klenera a kol. (2002) jsou nádorové markery rozděleny do skupin bez ostrého rozhraní:

Onkofetální antigeny – fyziologicky jsou produkovány ve fetálním období. Po narození mohou signalizovat nádorové onemocnění. Zahrnují např. AFP, HCG, CEA, PLAP (placentární alkalická fosfatáza).

Tkáňově či orgánově specifické antigeny – fyziologicky jsou přítomny ve zdravé tkáni nebo orgánu. Mimo tuto tkáň se uvolňují při nádorovém procesu, v menším množství také při zánětech a traumatech. Jsou to např. PSA, PAP v dnešní době již téměř nepoužívaná, NSE, mozkový S-100b protein, rozpustné fragmenty cytokeratinů TPA, TPS, CYFRA 21-1, CA antigeny definované pomocí monoklonálních protilátek, SCC, TG, hormony a ukazatele kostního metabolismu při výskytu metastáz do kostí.

Nespecifické antigeny a nádorové markery – FER, LD, TK, B₂M, RAF, LASA a další.

3.2.3 Předpoklady využití stanovení nádorových markerů

3.2.3.1 Vlastnosti ideálního nádorového markeru

Vyšetření nádorových markerů slouží v dnešní době k podpoře informací při terapii a monitorování pacientů s nádorovým onemocněním. Stanovení nádorových markerů je velmi potřebné ještě před zahájením léčby při stanovení diagnózy pro následné posuzování dynamiky při sledování efektu léčby a návratu nemoci (Nekulová a kol., 2006).

Ideální tumorový marker by měl splňovat tyto podmínky:

- vysoká orgánová specifita, tzn. vypovídat o zasažení konkrétního orgánu
- vysoká specifita maligního onemocnění, tzn. poskytovat pozitivní výsledek pouze u pacientů se zhoubným nádorem. Převážná většina nádorových markerů však dává pozitivní výsledek i u nenádorových onemocnění, zvláště zánětlivých, avšak většinou jde o mírně nebo středně zvýšené koncentrace. Např. u jaterní cirhózy a hepatitid mohou být zvýšené hladiny CEA, AFP, CA 15-3. CEA je také zvýšen u kuřáků a zánětů pankreatu. PSA poskytuje vyšší hladiny u benigní hyperplazie prostaty, β_2 -mikroglobulin a CA 15-3 u snížené glomerulární filtrace, HCG v těhotenství, apod.

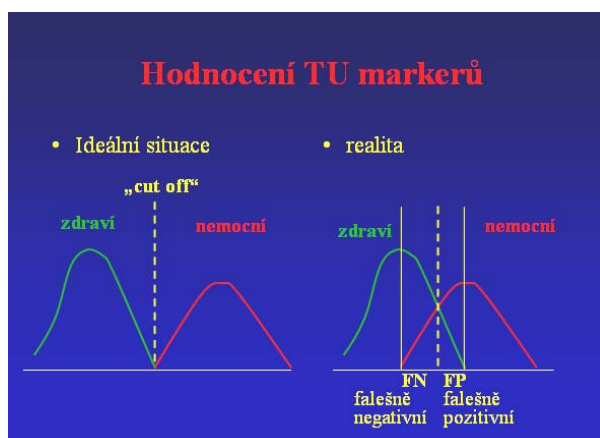
- vysoká citlivost, tzn. poukázat na přítomnost maligního nádoru v samém počátku. Ve skutečnosti jsou nádorové markery pozitivní až v pokročilém stadiu onemocnění.

- hladina nádorového markeru by měla korelovat s velikostí nádoru, tj. množstvím nádorových buněk, s rozsahem nádoru a stupněm zralosti maligních buněk a schopností produkce a vyplavení markeru.

Koncentraci nádorových markerů však ovlivňují i jiné faktory, např. glomerulární filtrace. Dobrá korelace je mezi koncentrací monoklonálních imunoglobulinů a počtem nádorových buněk u pacientů s mnohočetným myelomem (Racek a kol., 2006).

3.2.3.2 Rozhodovací hranice „cut-off“

Při diagnostice primárního nádorového onemocnění tvoří diskriminační hranici, tzv. „cut-off value“, pro hodnocení zvýšené hladiny nádorového markeru koncentrace, pod níž leží většina hodnot zdravých lidí a nemocných s benigním onemocněním. Pro hodnocení návratu nemoci, tj. sekundární diagnostiku, je nutno vztahovat hodnotu na pacienty v kompletní remisi. „Cut-off“ a senzitivita mohou být pro primární a sekundární diagnostiku odlišné (Nekulová a kol., 2006). Hodnota „cut-off“ tvoří hranici positivity a negativity nádorového markeru. Pacient s maligním nádorem a hladinou tumorového markeru pod hodnotou „cut-off“ je falešně negativní. Hodnota vyšší u zdravého člověka je falešně pozitivní. V současnosti se toto označení nahrazuje individuálním hodnocením hladiny nádorových markerů na základě dynamiky změn (Klener a kol., 2002).



Obrázek 1

3.2.3.3 Diagnostická senzitivita a specifita

Hodnota nádorového markeru závisí na jeho senzitivitě a specifitě. Specifita znamená procento zdravých lidí nebo s benigním onemocněním a s negativním výsledkem nádorového markeru. Vysoká specifita snižuje falešně pozitivní nálezy. Senzitivita je procento správné positivity u pacientů s maligním onemocněním. Vysoká senzitivita snižuje falešně negativní nálezy (Klener a kol., 2002).

Ideální marker by měl vykazovat 100% specifitu (správnou negativitu) při zároveň co nejvyšší senzitivitě (správném zachytu nemocných). Žádný z dosud známých nádorových markerů těchto ideálních hodnot nedosahuje. Z toho vyplývá, že pozitivní výsledek neznamena vždy přítomnost maligního nádoru, a negativní výsledek naopak není zárukou nepřítomnosti zhoubného nádoru. Nádorové markery umožňují odhalit počet asi 10^6 nádorových buněk, což představuje nádor o hmotnosti 1mg. Klinicky je možno detekovat většinou počet 10^9 nádorových buněk. Diskriminační hodnota se uvádí tak, aby odpovídala 95% specifitě s uvedením příslušné senzitivity. Vztah specifity a senzitivity vyjadřuje ROC-křivka (Receiver Operating Characteristics). Probíhá-li křivka co nejbližší levé ose senzitivity a horní ose, znamená její velké zakřivení vhodnost nádorového markeru pro určitou diagnózu. Procentuální hodnoty senzitivity a specifity charakterizují jednotlivé testy. Další ukazatele jsou predikční hodnoty, tj. hodnocení pravděpodobnosti. Pozitivní predikční hodnota (PPH) vyjadřuje pravděpodobnost, že při pozitivní hodnotě nádorového markeru je vyšetřovaná osoba skutečně nemocná. Negativní predikční hodnota (NPH) vyjadřuje pravděpodobnost, že při negativní hodnotě je osoba skutečně zdravá (Nekulová a kol., 2006).

$$PPH = \frac{\textit{správně pozitivní}}{\textit{všichni s pozitivním testem}}$$

$$NPH = \frac{\textit{správně negativní}}{\textit{všichni s negativním testem}}$$

(Racek a kol.,2006)

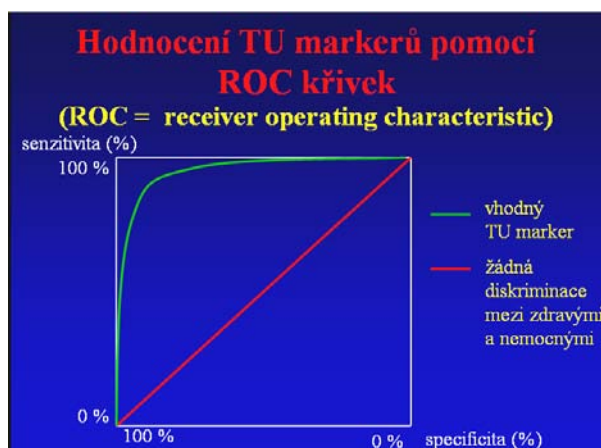
3.2.3.4 ROC-křivka

ROC-křivka vyjadřuje vztah mezi diagnostickou senzitivitou, tj. podíl počtu nemocných se správně pozitivním testem k celkovému počtu testovaných nemocných, a diagnostickou specifícností, tj. podíl počtu zdravých osob se správně negativním testem k celkovému počtu testovaných zdravých osob. ROC-křivka zachycuje senzitivitu a 1-specifícnost, neboli 100-specifícnost v %, což vyjadřuje vlastně nespecifícnost. Při sestrojení ROC-křivky se při různých hodnotách „cut-off“ posuzuje:

počet správně pozitivních a správně negativních výsledků u osob s prokázaným maligním onemocněním

počet správně negativních a falešně pozitivních výsledků u osob bez prokázaného onemocnění

z výsledných hodnot se stanoví diagnostická senzitivita a specifícnost na sestrojené křivce odpovídá každý bod jedné hodnotě „cut-off“.



Obrázek 2

Způsoby hodnocení ROC-křivky:

obvykle je uváděna hodnota senzitivity při specifícnosti 90 či 95%, nebo je možno uvést obě hodnoty při konkrétní hodnotě „cut-off“. Další možností je uvedení obou hodnot v tzv. operačním bodě, tj. v místě největšího zakřivení grafu.

míra vyklenutí křivky směrem k levému hornímu rohu grafu vyjadřuje diagnostickou efektivitu, tzn. jak vysoká je senzitivita i specifícnost. Tento ukazatel

je možno vyjádřit také jako plochu pod křivkou (AUC). Je-li AUC menší než 50%, test nemá dostatečnou rozlišovací schopnost.

Pozitivní věrohodnost laboratorního testu (LR+) vyjadřuje směrnice křivky v jednotlivých bodech. Vysoké LR+ svědčí o lepší schopnosti testu zachytit nádorové onemocnění s co nejmenší chybou (Racek a kol., 2006).

3.2.4 Praktické využití nádorových markerů v klinické praxi

3.2.4.1 Screening a primární diagnostika

Pro screening a primární diagnostiku stanovení nádorových markerů nejsou příliš vhodná, neboť většina nádorových markerů vykazuje nízkou diagnostickou senzitivitu a nedostatečnou specifitu. Screening je vhodný u symptomatických nemocných a u skupin s vysokým rizikem. Např. vyšetření AFP je vhodné u pacientů s jaterní cirhózou, u kterých je vyšší riziko vzniku hepatocelulárního karcinomu, vyšetření TPA/TPS u profesních skupin s rizikem vzniku karcinomu močového měchýře, stanovení kalcitoninu v rodinách s výskytem medulárního karcinomu štítné žlázy, vyšetření AFP a HCG u rizika vzniku nádorů zárodečných buněk, průkaz monoklonálních imunoglobulinů u možnosti výskytu mnohočetného myelomu, stanovení PSA u mužů nad 50 let vzhledem k riziku vzniku karcinomu prostaty. Ani v prognóze nejsou nádorové markery příliš podstatné (Nekulová a kol., 2006).

3.2.4.2 Průběh a remise nádorového onemocnění

Významnou roli zastávají nádorové markery ve sledování průběhu nádorového onemocnění, pro hodnocení remise a u podezření na reziduální nádor. Zvýšené hladiny upozorňují na návrat choroby, tzv. „lead time“, předcházejí klinickou diagnózu o 3-6 měsíců (Nekulová a kol., 2006).

3.2.4.3 Účinnost terapie

Důležitou oblastí indikace vyšetření nádorových markerů je sledování účinnosti terapie. Biologické poločasy jednotlivých markerů mají široké rozmezí, a proto je nezbytné správně volit intervaly krevních odběrů, aby se neprojevil tzv. „lysis fenomén“, tj. prudký vzestup hladiny sledovaných markerů v krátké době, který představuje odpověď na terapii (Nekulová a kol., 2006). Po ozáření nebo

chemoterapii dochází k přechodnému vzestupu nádorových markerů, jehož příčinou je rozpad nádorových buněk a uvolnění markerů, a následně se jejich koncentrace rychle sníží (Klener a kol., 2002).

Doporučuje se vyšetření nádorových markerů provádět nejdříve ve 3. až 4. týdnu od zahájení terapie. Úspěšnost terapie signalizuje pokles koncentrace nádorových markerů, která byla před léčbou zvýšena dvojnásobně oproti referenční hranici, nejméně o 50% po dvou měsících terapie. Je potřeba dodržovat doporučení WHO pro frekvenci vyšetřování nádorových markerů a brát zřetel na dynamiku změn v průběhu onemocnění. Vyšetření markerů je doporučováno před aplikací terapie a po skončení terapie, většinou 3. až 4. týden podle poločasů markerů, také při změně léčby a při nejasném průběhu onemocnění. Doporučené intervaly:

- 1 měsíc v prvním roce po primární léčbě
- 2 měsíce ve druhém roce
- 3 měsíce v dalších letech

Výrazné zvýšení hladin nádorových markerů ve třech po sobě následujících odběrech u pacientů v klinické remisi bez léčby signalizují recidivu, nebo progresi choroby. Zvýšení může být i v mezích referenčních hodnot. Zvýšení koncentrace o více než 25% v průběhu terapie se považují za progresi nemoci. Poklesnou-li hodnoty během léčby o více než 50%, znamenají parciální remisi (Nekulová a kol., 2006).

3.2.5 Kvalita stanovení nádorových markerů

Doporučení EGTM (European Group on Tumor Markers) shrnuje požadavky na kontrolu kvality stanovení nádorových markerů a doporučuje nejlepší využitelnost těchto testů. Kvalita výsledků závisí na dodržování zásad preanalytické, analytické a postanalytické fáze stanovení (Šimíčková, 2001b).

3.2.5.1 Požadavky na preanalytickou fázi

- vzorek se většinou používá sérum nebo plasma dle instrukcí výrobce, rozdílů mohou vzniknout při použití EDTA-plasmy přítomností komplementu, nebo použitím gelových zkumavek
- rychle oddělené sérum je možno uchovávat krátkodobě při 4°C, dlouhodobě zmražené při -30°C

- separaci séra pro stanovení volné frakce PSA je nutno provést do 3 hodin, nevhodné je zahřátí vzorku pro HCG a PSA
- potřeba odběru vzorku před terapií
- v době menstruace a po operacích v břišní dutině mohou být výsledky CA 125 falešně pozitivní, falešnou pozitivitu PSA způsobuje manipulace s prostatou a infekce močových cest
- falešnou pozitivitu mohou způsobovat diagnostické a léčebné postupy, doporučuje se zaznamenat léčbu monoklonálními protilátkami na žádanku
- poškození ledvin může být příčinou falešné positivity CEA, TPA a dalších cytokerinů, cholestáza může vést k falešně zvýšeným hladinám CA 19-9
- vzorek kontaminovaný slinami poskytuje falešně pozitivní výsledky CA 19-9, SCC, CEA, TPS (Šimíčková, 2001b).

3.2.5.2 Požadavky na analytickou fázi

Podmínkou je dodržování kritérií vnitřní a vnější kontroly kvality (IQA, EQA): reprodukovatelnost, vhodná logická kritéria pro IQC, kontrolní materiál s největší možnou podobností matrix také z jiných zdrojů, než ze soupravy ke stanovení, kontrolní vzorky pokrývající celý rozsah měření, kontrola interference, např. lidských anti-myších protilátek (HAMA).

koncentrace analytů v kontrolních materiálech v pracovní oblasti testovaných analytů včetně ředění a nulové koncentrace, dlouhodobá stabilita, správnost a reprodukovatelnost konečných hodnot, interpretace, eliminace možných chyb u zahnutí křivky při výrazně vysokých koncentracích analytů vedoucí k falešné negativitě a přenosu mezi vzorky (Šimíčková, 2001b).

3.2.5.3 Požadavky na postanalytickou fázi

odběr doplněný o stručnou klinickou informaci, referenční rozmezí pro zdravou populaci a pro skupinu s benigním onemocněním, nebo v kompletní remisi, a vlastní linie individuálního nemocného

upřesnění vzestupu, nebo poklesu o 25%, dlouhodobý výpis při změně metody a vyšetření předchozího odběru novou metodou, znalost poločasu tumor markerů v krvi - vhodné pro AFP a HCG, objektivní klinická informace o využitelnosti stanovení (Šimíčková, 2001b).

3.2.6 Laboratorní diagnostika u nádorových onemocnění

3.2.6.1 Indikace

Stanovení nádorových markerů v krvi, na rozdíl od ostatních diagnostických metod, např. biopsie, patří mezi málo invazivní vyšetření, stanovení trvá kratší dobu a je možno jej opakovat. Indikace vyšetření by měla být cílená a účelná, interpretace výsledků kvalifikovaná, což vyžaduje široké teoretické znalosti.

3.2.6.2 Odběr biologického materiálu

Preanalytické fáze zahrnuje správnou techniku odběru materiálu, správná stabilizační a protisrážlivá činidla a přesné označení a identifikace materiálu. Součástí je také správná poučenost a příprava pacienta, který má být před odběrem v ranních hodinách 10–12 hodin nalačno, má být v klidu a dodržet popř. dietní opatření.

3.2.6.3 Skladování a transport vzorku

Po separaci je nutno sérum uchovávat při teplotě 2-8°C, pro uchování po delší dobu je nutné sérum zamrazit. Je nutno zamezit možné kontaminaci vzorku slinami nebo potem.

3.2.6.4 Interpretace výsledků

Pro správnou interpretaci výsledků je důležitý věk pacienta a dietní návyky. Léky, drogy, terapeuticky podávané monoklonální protilátky mohou interferovat a změnit laboratorní výsledky. Interpretace výsledků stanovení nádorových markerů je nutno provádět v souvislosti s klinickým stavem pacienta, s výsledky ostatních diagnostických metod a je nutno monitorovat dynamiku.

3.2.6.5 Ostatní vyšetření

U pacientů s nádorovým onemocněním, nebo při podezření na maligní proces by základní vyšetření mělo obsahovat stanovení krevního obrazu, chemické vyšetření moče a močového sedimentu, biochemické parametry, okulní krvácení do stolice – také jako prevence u osob nad 50 let a stanovení nádorových markerů podle specifčnosti nádoru. Vlivem maligního procesu a následnou závažnou reakcí v organismu, nekrózou, nebo metastázami mohou být ovlivněny i jiné laboratorní parametry. Snížené bývají často: glukóza, celková bílkovina,

albumin, prealbumin, hemoglobin z nedostatku železa, vitamínu B12, vlivem malnutrice, krvácení, apod. Se zvýšenými hladinami se setkáváme u těchto parametrů: kyselina močová, kalcium, globuliny a přítomnost monoklonálních imunoglobulinů u maligního myelomu, laktát, leukocyty, hematurie a atypické nádorové buňky v močovém sedimentu, zvýšení jaterních testů a markerů obstrukce žlučových cest – GMT (γ -glutamyltransferáza), ALP (alkalická fosfatáza), cholesterol, bilirubin, zvýšené hladiny urey a kreatininu u renální nedostatečnosti až selhání, nález ascitu, pleurálního výpotku, změny ve vyšetření kostní dřeně, a další (Zima a kol., 2007).

3.2.7 Jednotlivé nádorové markery

Mezi nejčastěji stanovované nádorové markery patří :

3.2.7.1 Karcinoembryonální antigen (CEA)

CEA je onkofetální glykoprotein s vysokým obsahem sacharidů, popsáný již v roce 1965. Jeho molekulová hmotnost je 180-200 kDa. Biologický poločas se pohybuje v rozmezí 2-16 dnů a je degradován v hepatocytech. CEA je fyziologicky produkován v membránách epiteliálních buněk embrya, v dospělosti pak v omezeném množství epiteliálními buňkami střevní sliznice, žaludku a bronchů. CEA je možné prokázat ve fetálním séru od 8. týdne těhotenství a vrchol dosahuje kolem 22. týdne gravidity.

Zvýšená koncentrace v séru, která však většinou nepřesahuje 10 $\mu\text{g/l}$, bývá u benigních onemocnění, např. u jaterní cirhózy, hepatitidy, pankreatitidy, u Crohnovy nemoci, ulcerózní kolitidy, u onemocnění plic, ledvin, žlučníku, mléčné žlázy a u střevních polypů. Zvýšené hladiny mají kuřáci v závislosti na počtu vykouřených cigaret a také alkoholici. CEA je obsažen hlavně ve tkáních karcinomů tlustého střeva a konečníku, u karcinomů mléčné žlázy je markerem druhé volby po CA 15-3. Patologické hodnoty CEA u metastáz do jater umožňují diferenciální diagnostiku od hepatomu (Šimíčková a kol., 2001a; Masopust, 2004a).

3.2.7.2 α -1-fetoprotein (AFP)

AFP je onkofetální glykoprotein o molekulové hmotnosti asi 67-72 kDa. Biologický poločas se pohybuje mezi 3-6 dny a degradace probíhá v játrech. Je

syntetizován ve vysokém množství v embryonálním žloutkovém vaku a ve fetálních játrech, zhruba do dvou let po porodu jeho hladina klesá na hodnoty zdravých dospělých lidí. Funkce AFP je pravděpodobně důležitá pro transport steroidů, těžkých kovů, bilirubinu, mastných kyselin, léků apod., pro růst a diferenciaci a pro imunitní systém.

Zvýšená exprese AFP genu je charakteristická pro regenerující játra dospělých jedinců a pro maligní nádory jater. Primární hepatomy produkují ve zvýšené míře AFP až v 70% případů. Zvýšeně syntetizován je zárodečnými nádory vaječníků i varlat, kde dosahuje senzitivity 80% a specifity 90% při neléčené nemoci, a spolu s HCG je používán k monitorování těchto malignit. AFP slouží také ke sledování fyziologického vývoje gravidity. Screeningovým vyšetřením AFP v séru matky lze diagnostikovat malformace plodu, Downův syndrom. Zvýšené hladiny AFP se vyskytují ve 20% také u nádorů střev, pankreatu, žaludku. Nespecificky může být hladina AFP zvýšena u hepatitid kojenců, cirhózy a nekrózy jater. Imunoreaktivní forma je tzv. volný AFP, vázanou formu nelze detekovat.

Pro screening je používáno stanovení AFP u pacientů s jaterní cirhózou, s chronickou hepatitidou B nebo C a u podezření na nádory varlat (Šimíčková a kol., 2001a; Masopust, 2004a).

3.2.7.3 Lidský choriový gonadotropin (HCG)

Hormon HCG je glykoprotein o molekulové hmotnosti 36,7 kDa tvořený dvěma podjednotkami α a β . β -podjednotka podmiňuje biologickou specifitu hormonu a je pro HCG specifická. α podjednotka má podobnou strukturu jako LH, FSH a TSH. HCG vzniká v buňkách placenty, udržuje v prvních šesti týdnech těhotenství žluté tělísko, podporuje produkci progesteronu a estrogenu a podílí se na imunitoleranci plodu a matky.

Stanovení HCG je využíváno k diagnostice časného těhotenství, u žen v postmenopauze, u ovariálních cyst a myomů. Během těhotenství má HCG spolu s AFP význam pro určení patologické gravidity, Downova syndromu, mnohočetné gravidity, hrozícího potratu i mimoděložního těhotenství.

Velký význam má stanovení hladiny HCG pro monitorování průběhu a stanovení závažnosti onemocnění u pacientů s nádory varlat. Téměř 100% senzitivitu vykazuje HCG pro choriokarcinomy. Screening vyšetření HCG se používá u

osob s příznaky a podezřením na nádory zárodečných buněk. Podle použité protilátky je možno laboratorně stanovit celkový β -HCG, tj. intaktní hormon dimer s volnou podjednotkou β , intaktní dimer HCG bez volné podjednotky β , volnou podjednotku β nebo v moči β -core fragment (Šimíčková a kol., 2001a; Masopust, 2004a).

3.2.7.4 CA 15-3

CA 15-3 je glykoprotein o molekulové hmotnosti asi 300-450 kDa, definovaný dvěma monoklonálními protilátkami. Stanovení CA 15-3 detekuje transmembránový mucin (PEM), zvaný také MUC1. MUC1-protein je exprimován na povrchu epitelálních buněk plodu, hlavně plic a jater. V dospělém organismu je produkován buňkami vývodů mléčné žlázy, slinných žláz a bronchů. CA 15-3 má biologický poločas asi 7 dní, je degradován játry a vylučován ledvinami.

Hlavní význam stanovení CA 15-3 v séru spočívá v monitorování pacientek s karcinomem prsu, kdy sérové hladiny jsou výrazně zvýšeny. Robustnost této metodiky umožňuje sledovat dynamiku změn koncentrací CA 15-3 a tím odhadnout vývoj nemoci. CA 15-3 dokáže předpovědět návrat onemocnění s předstihem i několika měsíců oproti diagnostickým zobrazovacím metodám. Metastázy bývají charakterizovány senzitivitou až 80%, relaps onemocnění 60-90%. Fyziologicky jsou hodnoty CA 15-3 zvýšeny v těhotenství. Falešnou pozitivitu způsobují benigní onemocnění prsu, trávicího ústrojí, jaterní cirhóza a hepatitidy, chronická renální insuficience, záněty plic a také revmatické onemocnění (Šimíčková a kol., 2001a).

CA 15-3 je velmi vhodným ukazatelem progresu onemocnění v lymfatickém systému a kostních metastáz (Masopust, 2004a).

3.2.7.5 CA 125

CA 125 je heterogenní glykoprotein s vysokým obsahem sacharidů a molekulové hmotnosti asi 200 kDa. Jeho biologický poločas je asi 4 dny, je degradován v játrech a vylučován ledvinami. V dospělosti probíhá omezená syntéza v epitelu vejcovodů, bronchů, dělohy, v epitelu zdravých vaječníků není prokazatelný.

CA 125 je až v 80% případů produkován epitelálními buňkami ovariálního karcinomu. CA 125 představuje marker první volby u serózního karcinomu ova-

rií, kdy dosahuje senzitivitu až 90% a zvýšení koncentrace CA 125 může předcházet diagnózu o 1-8 měsíců. U dalších gynekologických nádorů vykazuje nižší senzitivitu. Každoroční screening CA 125 je doporučen pouze u žen s genetickou zátěží. Zvýšené hodnoty mohou vykazovat rovněž benigní onemocnění ovaríí, endometria, chronická onemocnění jater, zánětu pobřišnice, selhání ledvin i chirurgický zásah (Šimíčková a kol., 2001a). CA 125 je vhodný pro rozlišení malignity od benigní formy. Zvýšené hladiny bývají také v plasmě těhotných žen, v plodové vodě, mléce a sekretu cervixu (Masopust, 1998).

3.2.7.6 CA 19-9

CA 19-9 se vyskytuje jako glykolipid ve tkáni, nebo jako mucin v séru. Je řazen k onkofetálním antigenům definovaným na základě monoklonální protilátky, která je odpovídající haptenu krevních skupin typu Lewis. Biologický poločas CA 19-9 v cirkulaci je asi 5 dní a je eliminován žlučí. Syntéza CA 19-9 probíhá v pankreatu, žlučových cestách a žaludku plodu. V dospělosti jsou stopy CA 19-9 produkovány ve žlázových strukturách pankreatu, žlučníku, bronchů. Asi 5-10% populace tento antigen netvoří, jedná se o osoby krevní skupiny Lewis a/b negativní.

CA 19-9 je markerem první volby pro monitorování průběhu onemocnění karcinomu pankreatu. Zvýšené hladiny CA 19-9 jsou typické také pro karcinomy pankreatu, žaludku, tlustého střeva, žlučových cest, jater a mucinózních nádorů ovaríí. Stanovení hodnoty CA 19-9 je možné provádět v séru, v ascitu a tekutinách benigních cyst vaječnicků a stanovuje se v kombinaci s CEA. Výrazně zvýšené hladiny signalizují vzdálené metastázy. Zvýšené hladiny CA 19-9 jsou pozorovány také u benigních a zánětlivých onemocnění, GIT, vaječnicků, jater a u obstrukčního ikteru (Šimíčková a kol., 2001a; Masopust, 2004a).

3.2.7.7 CA 72-4

CA 72-4 (tumor-asociovaný antigen, TAG 72) je glykoprotein charakterizovaný pomocí dvou monoklonálních protilátek. Je degradován v játrech a vylučován močí. Fyziologicky je produkován fetálním epitelem žaludku, jícnu a pankreatu. V dospělém věku je syntetizován maligními nádory žaludku, dolní třetiny jícnu, střeva, pankreatu, mléčné žlázy a mucinovými typy ovariálních karcinomů. Jako biologický materiál ke stanovení hladiny CA 72-4 je možné použít sé-

rum, ascites nebo tekutinu pankreatických cyst, ve které v kombinaci s CEA je možné rozlišit benigní a maligní proces.

Vysokou 100% specifitu při 50% senzitivě vykazuje CA 72-4 pro monitorování průběhu nemoci u karcinomu žaludku. Zvýšené hodnoty mohou být prokázány v séru u jaterní cirhózy, akutní i chronické pankreatitidy, vředové choroby žaludku a zánětlivých nemocí GIT (Šimíčková a kol., 2001a; Masopust, 2004a).

3.2.7.8 TPA (tkáňový polypeptidový antigen) a TPS (tkáňový polypeptidový antigen specifický)

TPA je fragment cytokeratinových podjednotek intermediárních filament. Předpokládá se, že tyto fragmenty se uvolňují do cirkulace během proliferace nádorové tkáně, nebo při její nekróze. TPA je ukazatelem progresu nádoru (Masopust, 2004b). Molekulová hmotnost TPA je asi 40 kDa, biologický poločas asi 7 dní. Fyziologická syntéza TPA/TPS probíhá v trofoblastu a v orgánech plodu, které se intenzivně dělí. V nízkých koncentracích je prokazatelný v dospělém věku ve tkáni močového měchýře, mléčné žlázy, plic a trávicího traktu.

Univerzální nádorové markery TPA/TPS dosahují vysoké senzitivity především u karcinomu močového měchýře. Jsou používány také pro monitorování pacientů s nádory plic, GIT a ledvin. Nespecifické zvýšení hladiny způsobují jaterní cirhóza, hepatitidy i infekční onemocnění (Šimíčková a Nekulová, 2004).

3.2.7.9 CYFRA 21-1 (fragment cytokeratinu 19)

CYFRA 21-1 je solubilní fragment cytokeratinu 19, polypeptid o molekulové hmotnosti 40 kDa. Fyziologicky je přítomna ve tkáni plic, dělohy a trávicího ústrojí. Specifický výskyt CYFRA 21-1 poskytuje vyšší orgánovou specifitu než TPA a TPS a je možné ji stanovit i v pleurálních výpotcích.

Hlavní význam stanovení hladiny CYFRA 21-1 spočívá v monitorování karcinomů plic, kdy senzitivita dosahuje 55%, dále u karcinomů močového měchýře, spolu s SCC u nádorů cervixu a u nádorů oblasti hlavy a krku. (Šimíčková a kol., 2001a). Fragment cytokeratinu 19 CYFRA 21-1 proniká do krevního oběhu po destrukci buněk. Používá se také k monitorování karcinomů ovaria (Masopust, 2004b).

3.2.7.10 PSA (prostatický specifický antigen), FreePSA (volná frakce PSA)

Glykoprotein PSA byl charakterizován v roce 1979. Je to serinová proteináza o molekulové hmotnosti 34 kDa. Fyziologicky je PSA produkován v epiteliálních buňkách žlázových vývodů, především prostaty. V séru je z 95% PSA vázán na α 1-antichymotrypsin, méně na α 2-makroglobulin, 10-25% i více se vyskytuje jako volná frakce. Biologický poločas PSA je asi 2 dny, volná frakce má poločas pouze minuty.

Vysoké hladiny PSA doprovázejí maligní nádory prostaty. Vyšší produkce PSA, kdy hodnoty většinou nepřesahují 10 μ g/l, doprovázejí benigní hyperplazii prostaty a prostatitidu. Zvýšené hodnoty v séru bývají přítomny po traumatu, po rektálním vyšetření, po biopsii prostaty, nebo mechanickém dráždění, např. po jízdě na kole. Obecná „cut-off“ koncentrace v séru se uvádí 4 μ g/l. U zdravých dospělých mužů závisí koncentrace na věku, do 50let od hodnot 2,5 μ g/l až do 6,5 μ g/l u nejstarší věkové skupiny. V rozmezí 4-10 μ g/l celkového PSA je využíváno stanovení volné frakce PSA pro rozlišení mezi maligním karcinomem prostaty a benigní hyperplazií. Poměr volného PSA k celkovému je obvykle u hyperplazie nad 15%, zatímco u karcinomů prostaty je výrazně nižší. Pro screening je doporučováno stanovení PSA jednou ročně u mužů od 50 let a u starších mužů s příznaky poruch močového traktu a s rodinnou zátěží. V 95% případů stoupají hodnoty u metastáz až nad 20 μ g/l (Šimíčková a kol., 2001a). V malém množství je hladina PSA detekovatelná i u žen, i v mateřském mléce, v plodové vodě, v séru těhotných žen. Je syntetizován zdravými i maligními buňkami mléčné žlázy s receptory pro progesteron (Masopust, 1998). Při celkové koncentraci 4-10 μ g/l PSA hodnoty poměru freePSA/totalPSA nad 0,25 vypovídají spíše pro hypertrofii, hodnoty pod 0,16 pro karcinom prostaty. Nový prognostický marker je doporučován chromogranin A, spolu se stanovením PSA (Masopust, 2004a).

3.2.7.11 Chromogranin A (CgA)

CgA je kyselý glykoprotein přítomný ve zdravých i maligně transformovaných neuroendokrinních tkáních. U těchto vykazuje CgA vyšší senzitivitu než NSE, nebo 5-hydroxyindoloctová kyselina v moči. Falešně pozitivní výsledky

jsou pozorovány při léčbě kortikoidy, u poruch jater a ledvin (Šimíčková, Nekulová, 2004).

3.2.7.12 NSE (neuron-specifická enoláza)

NSE je glykolytický enzym obsažený v cytoplasmě buněk, který je fyziologicky produkován nervovou a plicní tkání plodu, v dospělosti především v neuronech. Stanovení NSE má prognostický význam u neuroblastomů a malobuněčných karcinomů plic. Vzhledem k obsahu NSE i v erytrocytech a trombocytech, ruší výrazně stanovení NSE v séru hemolýza vzorku. Je nutno separovat krevní částice do jedné hodiny po odběru, aby naměřené hladiny NSE nebyly falešně pozitivní. U nádorů CNS je vhodnější stanovovat koncentraci NSE v likvoru (Šimíčková a kol., 2001a).

3.2.7.13 SCC (antigen skvamózních buněk)

SCC je definován jako složka směsného antigenu TA-4, prokázaného v séru nemocných s karcinomem děložního čípku. Zvýšená syntéza probíhá hlavně u karcinomu děložního čípku, také u karcinomu plic, u nádorů těla děložního, endometria a dalších gynekologických nádorů (Šimíčková a kol., 2001a). SCC může být také zvýšen u generalizovaného ekzému, psoriázy, u zánětů ledvin a také u gravidních žen (Masopust, 2004b).

3.2.7.14 β_2 -mikroglobulin (B₂M)

B₂M je polypeptid o molekulové hmotnosti 11,8 kDa a biologickým poločasem 40 minut. Sekvencí aminokyselin a trojrozměrnou strukturou je homologní s konstantní částí těžkého řetězce IgG a tvoří extracelulární doménu lidského leukocytárního antigenu I. třídy. Je syntetizován především v B-lymfocytech a plazmocytech. Význam stanovení koncentrace B₂M spočívá hlavně při monitorování léčby systémového onemocnění B-lymfocytárního systému, u mnohočetného myelomu, non-hodgkinských lymfomů původu v B-lymfocytech, u chronické lymfocytární leukemie. Falešně pozitivní výsledky jsou pozorovány u poruch ledvin, u chronických zánětů a autoimunitních onemocnění, u kolagenóz a revmatické artritidy (Šimíčková a Nekulová, 2004).

3.2.7.15 TK (thymidinkináza)

TK je řazena k enzymům syntézy DNA typických pro proliferující tkáň. TK katalyzuje fosforylaci thymidinu na thymidinmonofosfát a tím umožňuje syntézu DNA náhradní, tzv. záchrannou cestou. Fyziologicky je TK produkována v játrech plodu, patologicky probíhá zvýšená syntéza v rychle proliferujících tkáních, především u hematologických malignit. Cytostatika, např. metotrexát, 5-fluorouracil, která blokují syntézu DNA „de novo“, falešně zvyšují hladinu TK. Proto je potřeba stanovit TK před nasazením chemoterapie.

Hlavní význam stanovení TK spočívá v monitorování stavů u akutních leukemií, non-hodgkinských lymfomů, také u maligního melanomu a nádorů štítné žlázy. Falešně pozitivní výsledky jsou způsobeny i infekcemi CMV, herpes viry a revmatickými onemocněními (Šimíčková a kol., 2001a).

3.2.7.16 Ferritin (FER)

FER je tkáňový protein, jehož hlavní funkcí je skladování zásobního železa. Za fyziologických podmínek je syntetizován buňkami sleziny, jater a kostní dřevě. Hladiny FER závisí na věku a pohlaví, v dětském věku jsou vyšší. Příčinou specifického zvýšení hladiny FER je akutní myeloblastická leukémie, hodgkinská choroba a mnohočetný myelom. Falešná pozitivita může být způsobena i po krevních transfuzích. Nespecificky jsou hladiny FER zvýšeny také u virových infekcí CMV a herpes viry (Šimíčková a kol., 2001a).

3.2.7.17 Protein S-100

S-100 je termolabilní kyselý glykoprotein vážící kalcium. V nervové tkáni se vyskytuje hlavně S-100 B, tj. dimer β - β , v příčně pruhovaných svalech je obsažen dimer α - α . Hlavní význam stanovení S-100 v séru spočívá v monitorování nemocných s melanomem, při výskytu metastáz dosahuje senzitivita až 80%. Zvýšené hodnoty bývají také u maligních nádorů mozku. Falešně zvýšené výsledky mohou být zapříčiněny poškozením mozku zánětlivými a infekčními procesy (Šimíčková a Nekulová, 2004).

3.2.7.18 Tyreoglobulin (TG)

TG je glykoprotein obsahující jód. Fyziologicky je produkován ve folikulárních buňkách štítné žlázy a je jodován jako prohormon na tyroxin a trijodtyronin.

Zvýšené hladiny doprovázejí malignity štítné žlázy. Příčinou falešné positivity v séru může být Basedowova choroba, eufunkční struma a záněty štítné žlázy (Šimíčková a Nekulová, 2004).

3.2.7.19 Kalcitonin (CT)

Polypeptid CT je fyziologicky produkován parafolikulárními C-buňkami štítné žlázy. Prekurzorem je prokalcitonin, jehož štěpením vzniká aktivní hormon. CT se účastní regulace metabolismu vápníku, snižuje aktivitu osteoklastů a podporuje syntézu kalcitriolu. Zvýšené koncentrace CT se vyskytují u medulárního karcinomu štítné žlázy. Příčinou falešné positivity může být pankreatitida, tyreoiditida, renální selhání, perniciózní anemie (Šimíčková a Nekulová, 2004).

3.2.7.20 Nádorový izoenzym pyruvátkinázy (TM2-PK)

TM2-PK je jedním z klíčových enzymů glykolýzy, katalyzuje přeměnu fosfoenolpyruvátu na pyruvát, je produkován nádorovými buňkami při zvýšeném metabolickém obratu nádorových buněk a při jejich nekróze. TM2-PK je vhodný marker pro lokalizaci u karcinomů varlat a nádorů ledvin, pro monitorování průběhu a terapie u nádorů prsu, pankreatu a tlustého střeva (Šimíčková a Nekulová, 2004).

3.2.7.21 Ostatní nádorové markery

Stanovení CA 50 má význam u karcinomů pankreatu, nádorů GIT a dělohy. Dosahuje však nižší specifiity.

MCA (mucin-like cancer antigen) je glykoprotein, fyziologicky je produkován v těhotenství, je obsažen i v mléce a moči zdravých žen. Zvýšené hodnoty bývají u karcinomu prsu (Šimíčková a kol., 2001a).

Ca 549 je kyselý glykoprotein, jeho zvýšené hladiny se nacházejí u karcinomu prsu, nádorů gynekologických, střeva, prostaty a plic. Oproti CA 15-3 vykazuje méně falešné positivity (Masopust, 1998).

CASA antigen spolu s CA 125 výrazně zvyšuje senzitivitu záchytu rozsevu ovariálních karcinomů. Dobrým prognostickým ukazatelem je u neléčených plicních karcinomů.

CA 195 je používán pro monitorování pacientů s karcinomy tlustého střeva, pankreatu, jater, a dalších nádorů.

TATI (s tumorem asociovaný trypsin inhibitor) je polypeptid fyziologicky produkován během vývoje plodu, bývá zvýšen u karcinomů pankreatu, ovaria, cervixu, žaludku, žlučových cest.

SP1 (β 1-specifický těhotenský glykoprotein) je přítomen v séru těhotných žen a používá se pro monitorování trofoblastických tumorů a nádorů varlat (Šimíčková a kol., 2001a).

Prostatický izoenzym ACP se odlišuje od ostatních tartarát-labilností. Vzhledem k nestálosti při pH vyšším než 7 se doporučuje plasmu po odběru ihned okyselit. Zvýšené hodnoty bývají přítomny u pacientů s nádory kostí a s metastázujícím karcinomem prostaty.

Kostní izoenzym ALP bývá zvýšen u kostních nádorů a metastáz do kostí.

Ubikviterní enzym laktátdehydrogenáza (LD) je velmi nespecifický ukazatel, často bývá zvýšen u hematologických malignit (Masopust, 1998).

Kathepsiny jsou lyzozomální proteinázy. Zvýšená produkce se vyskytuje u karcinomu mléčné žlázy, ovaria a GIT.

ACTH (adenokortikotropní hormon) je ve zvýšené míře produkován nádory adenohypofýzy, malobuněčnými karcinomy plic, pankreatu, prsu, žaludku, tlustého střeva.

Stanovení metabolitů hormonů dřeně nadledvin v moči, kyseliny vanilmandlové a homovanilové, se používá pro diagnostiku neuroblastomu a feochromocytomu. Pro diagnostiku karcinoidu je využíváno stanovení kyseliny 5-hydroxyindolactové (Masopust, 2004a).

3.2.7.22 Nové nádorové markery

Mezi perspektivní nádorové markery patří protein p-53, produkt mutovaného tumor-supresorového genu *p53*. Mammaglobin by mohl být užitečný pro léčbu nádorů prsu. Pomocí nových markerů B305D, GABA π , B726P je možné zjistit i mikrometastázy v mízních uzlinách a kostní dřeni u karcinomu prsu. Nízká koncentrace aktivátoru plasminogenové urokinázy (uPA) a inhibitoru (PAI-1) je prognostickým ukazatelem dlouhodobého přežívání pacientek s nádory prsu. Prognostický význam má rodina kallikreinů u pacientů s karcinomem močového měchýře a také hladina rozpustného fragmentu receptoru pro interleukin 2 u zhoubných nádorů hlavy a krku. Stanovení progastrin-releasing peptidu slibuje lepší citlivost a specifitu pro malobuněčný karcinom plic než NSE a CEA. Stanovení ICTP (Pyridinoline cross-linked carboxyterminal telopeptid of type I collagen) v séru je dobrým prognostickým ukazatelem kostních metastáz, jeho hladina bývá zvýšena také u mnohočetného myelomu.

Mezi nově sledované ukazatele nádorového bujení patří zvýšené množství volné DNA, nevázané na buněčné struktury. Byla prokázána nádorová mRNA pro tyrozinázu u metastazujícího melanomu, mRNA pro telomerázu u karcinomů. Biologické markery v nádorové tkáni umožňují správně hodnotit biologické vlastnosti nádoru, např. klíčové enzymy syntézy DNA thymidylátsyntáza, thymidinfosforyláza nebo dihydrothymidin-dehydrogenáza, také guanylyl-cykláza (Masopust, 2004c).

3.3 Laboratorní stanovení nádorových markerů

Pro stanovení koncentrace nádorových markerů se používají imunochemické analýzy, jejichž principem je reakce antigenu, tj. nádorového markeru, a specifické protilátky. Pro detekci imunochemického komplexu je využíváno značení radionuklidem, radioimunoanalýza (RIA), nebo imunoradiometrické stanovení (IRMA), značení enzymem, enzymoimunoanalýza (EIA, ELISA) a značení fluorescenčním nebo luminiscenčním indikátorem (FIA, LIA). Nádorové markery jsou v krvi obsaženy ve velmi nízkých koncentracích, obvykle v $\mu\text{g/l}$, nebo je koncentrace udávána v konvenčních jednotkách U/l (Nekulová a kol., 2006).

3.3.1 Imunochemické reakce

Rozvoj imunochemických metod začal v 80. letech a dosud nedosáhl svého vrcholu. Imunochemické metody umožňují specifické a citlivé stanovení stále nových antigenů a protilátek obsažené ve vzorku ve velmi nízkých koncentracích (Racek a kol., 2006).

Základem imunochemické reakce je interakce mezi antigenem a protilátkou za vzniku komplexu antigen-protilátka. Imunochemické reakce *in vitro* musí probíhat v podmínkách, které zajišťují optimální hodnotu pH, optimální osmolalitu, teplotu a optimální poměry mezi množstvím antigenu a protilátky. Vznikající nerozpustný imunochemický komplex má nejvyšší stabilitu v tzv. zóně ekvivalence, kdy rozmezí poměrů antigenu a protilátky je optimální. V přebytku antigenu nebo protilátky podléhá komplex rozkladu. Imunochemické reakce využívají monoklonální protilátky, u kterých oproti polyklonálním séřům je vyloučena heterogenita a možnost zkřížené reakce. Ultrasenzitivní imunochemické reakce jsou vysoce citlivé metody a slouží k detekci látek přítomných v tělních tekutinách ve velmi malých koncentracích, v $\mu\text{g/l}$ až pg/l (Krejsek a Kopecký, 2004).

3.3.1.1 Antigeny

Antigeny jsou z chemického hlediska polymery, a to proteiny, polypeptidy, polysacharidy, nebo nukleoproteiny. Základními vlastnostmi antigenů je schopnost navodit buněčnou a protilátkovou specifickou imunitní odpověď a specifickou

ky reagovat s produkty odpovědi, tj protilátkami a imunokompetentními buňkami. Kompletní antigen tvoří makromolekulový nosič a antigenní determinanty (epitopy) na povrchu, které charakterizují specifitu antigenu a schopnost reagovat s vazebným místem protilátky, nebo receptorem lymfocytu. Principem imunochemických reakcí je vazba antigenních determinant s vazebným místem protilátky (Anonym 4, 2007).

3.3.1.2 Protilátky

Protilátky, neboli imunoglobuliny (Ig), představují heterogenní skupinu glykoproteinů s elektroforetickou pohyblivostí β až γ (Anonym 4, 2007).

3.3.1.3 Molekulová stavba protilátek

Molekuly imunoglobulinů jsou tvořeny bílkovinnými řetězci a doménami. Svým tvarem jsou podobné písmenu Y. Molekula Ig se skládá ze dvou těžkých řetězců H a na jejich N-koncové části jsou vázány lehké řetězce L. V tzv. „pantové oblasti“ jsou H řetězce spojeny disulfidickými můstky. Těžké řetězce jsou rozlišovány podle struktury do pěti tříd IgG, IgM, IgA, IgD a IgE, dále na podtřídy IgG₁ až IgG₄ a IgA₁, IgA₂. Lehké řetězce typu κ , nebo λ mohou být přítomny na jedné molekule Ig pouze v jedné formě. N-koncové části řetězců jsou nazývány V-úseky, neboli variabilní části, a mají odlišnou primární strukturu. C-koncové úseky řetězců, neboli konstantní části, mají pro různé Ig obdobnou primární strukturu. Domény jsou globulární struktury stabilizované disulfidickými můstky. Variabilní V-domény jsou přítomny na N-koncových částech H a L řetězců, jsou tvořeny asi 110 aminokyselinovými zbytky pestrého složení.

Specifická funkce protilátek je určována strukturou variabilních domén, ve kterých je možno dále rozlišit tři hypervariabilní oblasti CDR1 až CDR3 (Complementarity Determining Region) s maximální variabilitou zbytků aminokyselin. V oblastech CDR dochází k interakci Ig s antigenními determinanty - epitopy. Vazby mezi epitopem a vazebným místem protilátky jsou zprostředkovány slabými vazebnými interakcemi – vodíkové můstky, elektrostatické síly, van der Waalsovy síly, hydrofobní síly. Síla této vazby je nazývána afinitou protilátky. Avidita protilátky představuje celkovou sílu všech vazebných míst protilátky, které reagují se všemi epitopy antigenu. Specifita protilátky je dána tva-

rem svých vazebných míst, a proto je nutné, aby tvar těchto míst odpovídal co nejlépe tvaru epitopů (Krejsek a Kopecký, 2004).

3.3.1.4 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky mají definovanou specifitu a je možné je používat k imunochemické identifikaci molekul s antigenními vlastnostmi. Monoklonální protilátky jsou získávány tzv. hybridomovou technologií, jejíž objevení bylo oceňováno Nobelovou cenou. Zdrojem monoklonálních protilátek je pouze jeden aktivovaný B lymfocyt, který po klonálním zmnožení produkuje identické molekuly Ig. Tyto monoklonální protilátky reagují se stejnou antigenní determinantou a mají zcela shodné i biologické vlastnosti.

Hybridomová technologie je vysoce dokonalá a její podstata spočívá v *in vitro* fúzi B lymfocytů, izolovaných ze sleziny myší po imunizaci vhodným antigénem, s myšími buňkami vzniklými maligní transformací plasmatické buňky, tzv. myelomovými buňkami. B lymfocyty představují zdroj protilátek a myelomové buňky jsou příčinou neomezeného proliferačního potenciálu. Takto uměle vytvořené hybridomové buňky jsou následně selektovány, klonálně množeny kultivací *in vitro*, nebo v peritoneální dutině laboratorních myší. Monoklonální protilátky jsou pak ze získaných tekutin purifikovány a biochemicky je charakterizována jejich specifika, CD (Cluster Designation) klasifikace dle CD nomenklatury, v rámci které je testována jejich reaktivita za fyziologických a patologických podmínek, dále je určována sekvence aminokyselin a uspořádání cílové molekuly (Krejsek a Kopecký, 2004).

3.3.2 Techniky imunoanalýz

Imunochemické metody mají vysokou citlivost a využívají značení jedné z reagujících složek, antigenu, nebo protilátky, vhodným radioizotopem, enzymem, fluorescenční nebo luminiscenční látkou.

3.3.2.1 Enzymoimunoanalýza (EIA)

EIA využívá ke značení antigenů a protilátek enzymů, nejčastěji alkalickou fosfatázu, křenovou peroxidázu nebo β -galaktosidázou. Pro označení alkalickou fosfatázou se používá jako substrát para-nitrofenylfosfát, pro peroxidázu peroxid vodíku, kdy uvolněný kyslík při enzymové reakci oxiduje bezbarvý chromogen (např. orto-fenylendiamin) na barevný produkt, jehož intenzita se měří fotometricky.

Podle uspořádání se techniky EIA dále dělí na kompetitivní (soutěživé) a nekompetitivní (nesoutěživé).

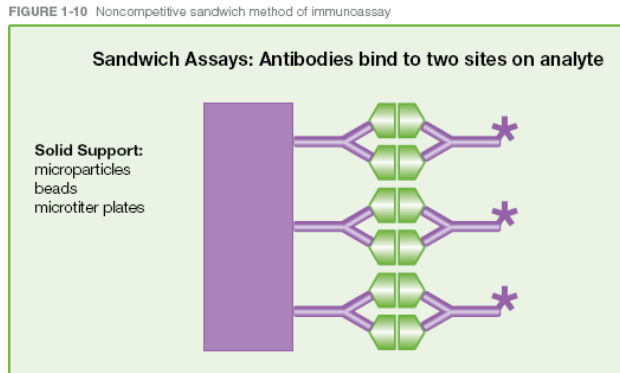
Nekompetitivní EIA

Tento sendvičový typ ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) je založen na vzniku sendvičového komplexu a pracuje s nadbytkem protilátky, nebo antigenu.

Nekompetitivní EIA pro stanovení antigenu - k provedení této techniky je zapotřebí dvou různých protilátek namířených proti různým epitopům stanovovaného antigenu. Antigen ve vzorku (Ag^{VZ}) tvoří v prvním kroku imunokomplexy s protilátkou (Ab) navázanou v nadbytku na pevné fázi. Po inkubaci a odstranění nenavázaných součástí vzorku promytím se přidá v nadbytku druhá protilátka značená enzymem (Ab^*). Vzniká sendvičový komplex protilátka na pevné fázi-antigen-značená protilátka ($Ab-Ag^{VZ}-Ab^*$). Po promytí a odstranění nenavázané značené protilátky se přidá substrát a měří se enzymová aktivita značeného imunokomplexu, který obsahuje antigen ze vzorku. Absorbance je přímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu.

Nekompetitivní EIA pro stanovení protilátky - antigen v nadbytku je vázán na pevnou fázi. Po přidání vzorku se stanovovanou protilátkou vznikají imunokomplexy, které jsou detekovány pomocí druhé značené protilátky proti stanovova-

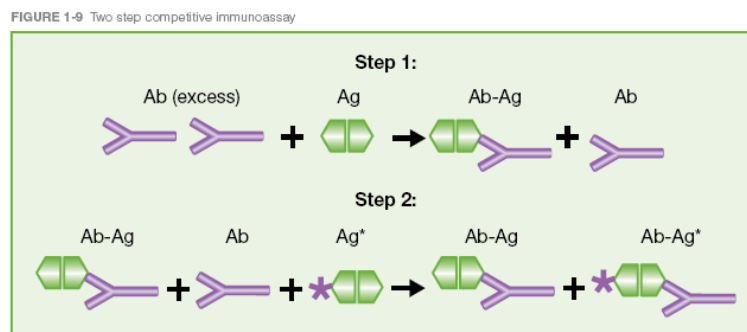
né protilátce, nebo pomocí značeného volného antigenu. Absorbance je přímo úměrná koncentraci stanovované protilátky ve vzorku (Doležalová a kol., 1995).



Obrázek 3

Kompetitivní EIA

Antigen ve vzorku (Ag^{VZ}) soutěží se značeným antigenem (Ag^*), který je přidán ve známém množství, o vazebná místa na specifických protilátkách (Ab) přítomných v reakci v limitovaném množství. Během inkubace vznikají komplexy antigenu ze vzorku s protilátkou ($Ag^{VZ}-Ab$) a komplexy značeného antigenu s protilátkou (Ag^*-Ab). Volné antigeny a antigeny značené jsou po inkubaci odstraněny promytím, aby nedocházelo ke zkreslení výsledků měření. Po přidání substrátu se měří enzymová aktivita vzniklého značeného imunokomplexu. Čím méně je ve vzorku přítomno stanovovaného antigenu, vzniká větší množství značeného imunokomplexu, a tím vyšší je výsledná měřená enzymová aktivita, a naopak. Absorbance je tedy nepřímo úměrná koncentraci antigenu ve vzorku (Doležalová a kol., 1995).



Obrázek 4

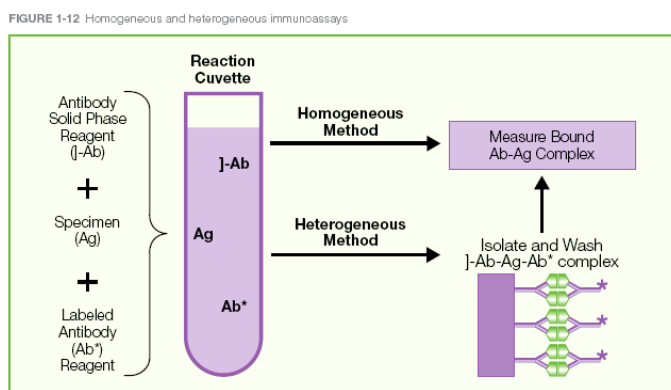
Kompetitivní metody se dělí na homogenní a heterogenní.

Homogenní kompetitivní EIA

Ke vzorku se stanovovaným antigenem (Ag^{VZ}) se přidá známé množství stejného antigenu značeného enzymem (Ag^*) a specifická protilátka (Ab) v limitovaném množství. Během imunochemické reakce soutěží antigen vzorku se značeným antigenem o vazebná místa na protilátce. Homogenní EIA nevyžaduje odstranění volného značeného antigenu od značeného imunokomplexu ($Ab-Ag^*$). Značený imunokomplex je inhibován, reakcí dochází ke změnám v mikrokolní značce, nevstupuje proto do reakce se substrátem. Výsledná enzymová aktivita volného Ag^* je přímo úměrná koncentraci antigenu ve vzorku.

Heterogenní kompetitivní EIA (ELISA)

Protilátka je v limitovaném množství navázána na povrch pevné fáze, např. zkumavky, mikrotitrační destičky, magnetické částice, Sephadex, PAAG, nebo silikonované kuličky. Po přidání vzorku (Ag^{VZ}) a značeného antigenu (Ag^*) vznikají imunokomplexy $Ag^{VZ}-Ab$ a Ag^*-Ab . Heterogenní uspořádání analýzy vyžaduje promytí a odstranění nezreagovaných značených reaktantů, neboť signál dávají jak vzniklý imunokomplex Ag^*-Ab , tak i volný Ag^* . Po promytí a inkubaci se substrátem se měří intenzita zbarvení produktu enzymové reakce a absorbance je nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu (Doležalová a kol., 1995).



Obrázek 5

3.3.2.2 Radioimunoanalýza (RIA)

Metody RIA využívají antigenu značeného radioizotopem, kterým je obvykle radioaktivní izotop jodu ^{125}I , nebo v případě haptenu tritium ^3H . RIA je kompetitivní heterogenní technika, která pracuje se značeným antigenem, stanovovaným antigenem a protilátkou v limitovaném množství. Antigen ve vzorku soutěží se značeným antigenem o vazbu na specifickou protilátku, která je v omezeném množství a může být vázaná na povrch pevné fáze. Po promytí a odstranění volného nezreagovaného značeného antigenu se měří radioaktivita imunokomplexu, která je nepřímo úměrná koncentraci antigenu ve vzorku. K měření radioaktivity se používá detektor γ -záření (Doležalová a kol., 1995).

3.3.2.3 Imunometrická analýza (IRMA)

IRMA je nekompetitivní metoda, která využívá tři reaktanty - stanovovaný antigen, první protilátku navázanou v nadbytku na pevnou fázi a druhou protilátku v nadbytku značenou radioizotopem namířenou proti jinému epitopu stanovovaného antigenu. Po inkubaci a vzniku sendvičového komplexu se promytím odstraní přebývající volná značená protilátka a měří se radioaktivita značeného imunokomplexu.

Nevýhodou izotopových imunoanalýz RIA a IRMA je nebezpečí práce s radioaktivním zářením, je nutno dodržovat bezpečnostní předpisy pro práci s radioizotopy a dbát na poločas rozpadu izotopů (Doležalová a kol., 1995).

3.3.2.4 Fluoroimunoanalýza (FIA)

FIA využívá ke značení antigenů a protilátek fluorescenční látku, např. rhodaminové deriváty, kumariny, umbelliferon, apod. FIA metody mohou být uspořádány jako kompetitivní, nebo nekompetitivní techniky. Vzniklé značené imunokomplexy jsou detekovány měřením fluorescence. Měření fluorescence je založeno na využití emisních spekter látek, které jsou schopny po absorpci elektromagnetického záření a excitaci emitovat sekundární světelné záření. Fluorescenční metody detekce jsou vysoce citlivé.

Mezi nesoutěživé FIA patří sendvičová metoda DELFIA (Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay). DELFIA využívá ke značení protilátky chelátu lanthanidového kovu europia. Ion europia vykazuje slabou fluorescenci, proto je nutno účinek zesílit přidáním zesilovacího činidla, se

kterým ion europia vytvoří silně fluoreskující chelát uzavřený v micelách (Doležalová a kol., 1995).

3.3.2.5 Fluorescenční polarizační imunoanalýza (FPIA)

FPIA je kompetitivní homogenní metoda. Detekce je založená na měření intenzity polarizovaného světla. Do reakce vstupují stanovovaný antigen, antigen značený fluoresceinem a protilátka v limitovaném množství. Antigeny soutěží o vazbu na specifickou protilátku a váží se na ni v poměru, v jakém jsou zastoupeny ve směsi. Dopadající modré polarizované světlo, které kmitá v jedné rovině, je zeslabeno v závislosti na množství volného značeného antigenu, který nezreagoval s protilátkou a má malou molekulu. Intenzita polarizovaného světla je nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu (Doležalová a kol., 1995).

3.3.3 Příklady technologií používaných v dnešní době

3.3.3.1 Metoda MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay)

(systém Abbott Laboratories AxSYM)

MEIA (enzymová imunoanalýza na mikročásticích) je metoda přizpůsobená pro automatické měření velkých molekul, jako jsou nádorové, srdeční, hepatální markery a hormony. MEIA využívá k měření roztok suspendovaných submikro-
nových latexových částic, které jsou potaženy specifickými protilátkami (antigeny, nebo virovými částicemi), na něž se specificky váže stanovovaný analyt. Povrch mikročástic zvyšuje kinetiku metody a snižuje dobu inkubace, proto doba stanovení je kratší.

Reagencie MEIA

mikročástice potažené záchytovými molekulami

konjugát – protilátky značené enzymem alkalickou fosfatázou

fluorescenční substrát – 4-methylumbelliferylfosfát (MUP)

Typy MEIA

dvoukroková MEIA - vzorek a mikročástice jsou smíchány v jamce reakční nádoby a konjugát reaguje na reakční matici.

Jednotlivé kroky metody:

inkubace mikročastic potažených protilátkou po smíchání se vzorkem, během které dochází ke vzniku imunokomplexů

z inkubační jamky reakční nádoby je procesní jehlou reakční směs nadávkována na reakční matici. Na skleněných vláknech matrice je imunokomplex zachycen a nadbytečná reakční směs je odstraněna promytím a proteče velkými póry matrice

na reakční matici je přenesen konjugát, který se váže na imunokomplex za vzniku sendviče - protilátka na mikročasticích-analyt ve vzorku-konjugát, a následuje promytí

na reakční matici je dávkován substrát MUP, který je konjugátem s alkalickou fosfatázou hydrolyzován na 4-methylumbelliferon (MU)

rychlost tvorby fluorescenčního produktu MU je opticky měřena. MEIA je metodou nekompetitivní a intenzita signálu je přímo úměrná koncentraci stanoveného analytu ve vzorku

jednokroková MEIA - vzorek, mikročastice i konjugát jsou současně smíchány v inkubační jamce reakční nádoby, následuje promytí matrice a po přidání MUP je měřen signál produktu MU.

Optický systém MEIA

Intenzitu fluorescenčního záření měří fluorometr s rtuťovou výbojkou jako světelným zdrojem. Záření o vlnové délce 365 nm je izolováno excitačním filtrem a dopadá na povrch reakční matrice. MU absorbuje excitační záření a přechází do excitovaného stavu. Při návratu do základního stavu emituje záření o vlnové délce 448 nm. Intenzita emitovaného záření po izolaci požadované vlnové délky systémem dvou filtrů je měřena fotonásobičem. Po přidání substrátu na matici je provedeno až 15 měření. Na základě změřených hodnot intenzity záření je vypočtena rychlost přeměny MUP na MU. Z grafu závislosti intenzity na čase a výsledné směrnice křivky se pomocí kalibrační křivky určí koncentrace stanoveného analytu (Abbott Laboratories, 2004; Anonym 5, 2008).

Technologii MEIA využívá i analyzátor IMx Abbott (Anonym 5, 2008).

3.3.3.2 Metoda CMIA (Chemiluminescent Magnetic Immunoassay)

(systém Abbott Laboratories ARCHITECT)

Základem mnoha přístrojů v klinických laboratořích je chemiluminiscenční technologie. Odlišují se specifickými typy značek, často jsou patentovány a liší se i provedením. Technologie Abbott ARCHITECT, zvaná Chemiflex, používá ke značení protilátek patentovaný akridinový derivát.

CMIA (chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročásticích) využívá ke stanovení koncentrace analytu ve vzorku tyto sloučeniny:

paramagnetické částice, které jsou obalené antigeny, protilátkami, nebo virovými částicemi a slouží jako specifické záchytové molekuly pro stanovovaný analyt

akridiniový konjugát – protilátka značená chemiluminiscenčním akridiniem

Pre-Trigger – roztok peroxidu vodíku

Trigger – roztok hydroxidu sodného

Sled reakcí CMIA

do reakční nádoby je k paramagnetickým mikročásticím obaleným protilátkou přidán vzorek a během inkubace vznikají imunokomplexy

po inkubaci jsou paramagnetické částice s navázaným specifickým analytem přitaženy magnetem ke stěně reakční nádoby a z reakční směsi je promytím odstraněna nenavázaná látka

detekce imunokomplexů je umožněna přidáním konjugátu protilátky značené chemiluminiscenčním akridiniem, který vazbou na imunokomplex během inkubace vytvoří sendvič

po promytí je dávkován Pre-Trigger, jehož funkcí je vytvoření kyselého prostředí, které zabrání předčasné emisi světla, pomáhá zabránit shlukování mikročástic, slouží k odštěpení akridinového barviva z konjugátu

následně je dávkován Trigger, působením peroxidu a zásaditého Triggeru projde akridinium oxidační reakcí a vzniká N-methylakridon, který při návratu do základního energetického stavu emituje světelné záření

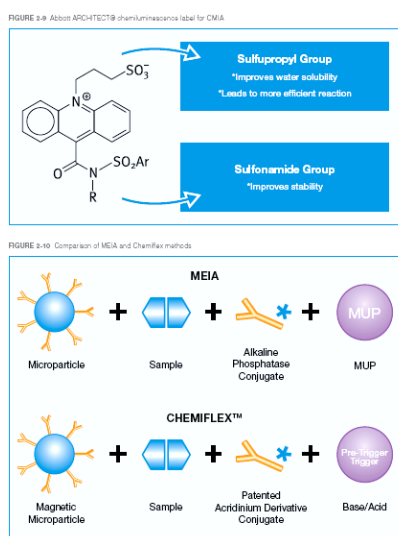
chemiluminiscenční emise je měřena po předem stanovenou dobu optickým systémem CMIA

Optický systém

Optický systém zachytí emitované světlo a odvede světlovodem do fotonásobiče. Jsou zachyceny emitované fotony a je provedeno aktivované čtení. Sig-

nál je shromažďován po stanovenou dobu a v závěru je proveden výpočet redukce dat, tj. způsob pro výpočet konečných čtení v jednotkách relativní světelné jednotky. Konečné čtení v relativních světelných jednotkách je získáno rozdílem hodnoty čtení pozadí od hodnoty aktivovaného čtení a je převedeno na jednotky koncentrace.

Systém umožňuje flexibilní protokoly předběžného zpracování, jednostupňové i dvoustupňové metody a statimové metody (Abbot Laboratories, 2005; Anonym 5, 2008)



Obrázek 6

3.3.3.3 Metoda ECLIA (Elektrochemiluminescent Immunoassay)

(systém Roche Diagnostics)

ECLIA (heterogenní elektrochemiluminiscenční imunoanalýza) využívá pro značení a detekci výsledného imunokomplexu rutheniový komplex. Ze stabilního prekursoru na povrchu elektrody procesem elektrochemiluminiscence (ECL) vzniknou vysoce reaktivní prvky, které reagují navzájem a tvoří světelné záblesky.

Princip a průběh ECL

Během první inkubace probíhá interakce stanovovaného antigenu, protilátky značené ruthenioým komplexem a protilátky značené biotinem. V průběhu druhé inkubace dochází k navázání vzniklého sendičového imunokomplexu vazbou biotin-streptavidin na magnetické mikročástice.

Reakční směs je naplněna měřicí cela a magnetické částice jsou přitaženy k povrchu elektrody.

Aplikací přesně definovaného napětí na elektrodu je navozena elektrochemiluminiscence a dochází k emisi fotonu z rutheniového komplexu. Na elektrodě probíhá oxidace rutheniového komplexu i substrátu TPA (tripropylamin), který je v nadbytku. Přeskok elektronu z radikálu TPA způsobí redukci rutheniového komplexu a následným návratem elektronu na základní hladinu dojde k vyzáření fotonu.

Počet fotonů je detekován fotonásobičem a výsledné koncentrace stanoveného analytu jsou odečteny z kalibrační křivky.

Princip ECLIA využívají analyzátoři Elecsys, Modular a Cobas Roche Diagnostics. (Anonym 6, 2008)

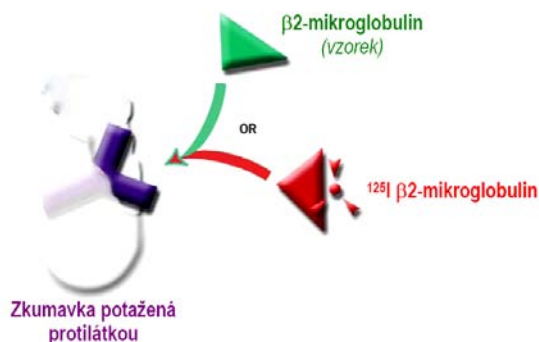


Obrázek 7

3.3.3.4 Metoda RIA (Radioimmunoassay)

(Immunotech A Beckman Coulter Company)

Radioimunoanalytické stanovení je kompetitivní metoda, která využívá specifické protilátky a radioindikátor, tj antigen značený ^{125}I . Specifickou protilátkou jsou potažené stěny zkumavek, ve kterých dochází po přidání vzorku a radioindikátoru ke vzniku značených i neznačených imunokomplexů podle zastoupení antigenů ve vzorku. Po inkubaci je nutno obsah zkumavek odsát a aktivitu navázaných imunokomplexů se měří γ -čítačem. Koncentrace stanoveného analytu je odečtena z kalibrační křivky.



Obrázek 8

3.3.3.5 Metoda IRMA (Immunoradiometric assay)

(Immunotech A Beckman Coulter Company)

Jednokrokové imunoradiometrické stanovení sendvičového typu je založeno na použití stejné monoklonální protilátky obsažené v radioindikátoru i na pevné fázi. Do zkumavek potažených specifickými protilátkami je přidán vzorek a po inkubaci a promytí následuje druhá inkubace s protilátkou značenou ^{125}I . Po inkubaci je nutno obsah zkumavek odsát a promýt a tím dojde k odstranění nenavázané značené protilátky. Aktivita ^{125}I se měří γ -čítačem. Koncentrace stanovovaného analytu je přímo úměrná měřené radioaktivitě. Imunoradiometrická sendvičová metoda využívá také dvou monoklonálních protilátek proti dvěma různým epitopům na molekule stanovovaného analytu. Do zkumavek potažených první protilátkou se přidá vzorek a roztok druhé protilátky značené ^{125}I . Po inkubaci se promytím odstraní nenavázaná značená protilátka a radioaktivita značených imunokomplexů se měří γ -čítačem. Výsledné koncentrace analytu ve vzorku jsou odečteny z kalibrační křivky (Anonym 7, 2008).

3.3.3.6 Metoda ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

(DRG International, Inc.)

ELISA je sendvičová metoda na mikrotitračních destičkách. Jamky destičky jsou potaženy protilátkou, která je namířená proti epitopu antigenní stanovované molekuly. Vzorek je inkubován v jamkách s enzymovým peroxidázovým konjugátem druhé protilátky značené enzymem, která je namířená proti odlišnému vazebnému místu na molekule antigenu. Po inkubaci je nenavázaný enzymový konjugát odstraněn promytím. Množství vázané značené protilátky je přímo úměrné koncentraci antigenu ve vzorku. Po přidání substrátu, inkubaci a zasta-

vení enzymové reakce zastavovacím roztokem, je měřena intenzita vzniklého zbarvení vertikálním spektrofotometrem a koncentrace stanoveného antigenu je odečtena z kalibrační křivky (Anonym 8, 2008).

3.3.4 Laboratorní metoda a její analytické vlastnosti

O vhodnosti laboratorní metody pro předpokládanou aplikaci rozhodují analytické vlastnosti metody, které nelze oddělit od vlastností klinických. Mezi nejdůležitější analytické vlastnosti mj. patří

přesnost – míra shody mezi výsledky získanými opakovanou analýzou stejného vzorku za předem stanovených podmínek. Přesnost představuje statistické vyhodnocení náhodných chyb. Míru rozptylu výsledků kolem průměrné hodnoty s normálním rozložením četnosti vyjadřuje směrodatná odchylka (SD). Obvykle se používá relativní SD v %, tzv. variační koeficient (CV).

pravdivost a správnost – těsnost shody mezi průměrnou hodnotou z velkého počtu měření a dohodnutou referenční hodnotou. Velikost odchylky, tzv. bias, je mírou pravdivosti a je dána velikostí systematické chyby.

Srovnání dvou metod pro stanovení stejného analytu slouží ke zjištění, že nová metoda neposkytuje výsledky jiné, že rozdíly v měřených hodnotách jsou způsobeny změnou zdravotního stavu pacienta. Srovnání se provádí metodou regresní analýzy. Vztah mezi výsledky obou metod je posuzován metodou lineární regrese. Míru rozptylu bodů kolem regresní přímky vyjadřuje korelační koeficient (r), jehož maximální hodnota v ideálním případě dosahuje 1,0. Nejdůležitějším požadavkem při monitorování stavu pacienta je laboratorní měření v čase s maximální přesností, tzn. SD, CV%. Pro diagnostické účely je kladen především důraz na požadavek co nejnižší systematické chyby (bias) (Racek, 2006).

3.3.4.1 Srovnání shody reagenčních šarží

Stanovení nádorových markerů je pomůckou lékařů v péči o onkologické pacienty a jejich klinické využití vyžaduje shodné výrobní provedení jednotlivých reagenčních šarží v průběhu času (Kula a kol., 2004a).

Srovnání reagenčních šarží testovali autoři analyzátořem IMx Abbott v průběhu 4 až 7 let, analyzátořem AxSYM Abbot v průběhu 5 až 7 let, analyzátořem

Architect Abbott v průběhu 4 až 5 let. Ke stanovení použili kontrolní materiály a skupiny sér připravených ze vzorků pacientů různé koncentrace v celém rozsahu měření. Výsledky měření mezi reagenčními šaržemi ohodnotili autoři jako shodné (Kula a kol., 2004a,b,c).

Analyzátor IMx

hodnoty CV pro kontrolní vzorky se pohybovaly do 5%, hodnoty CV pro vzorky sér nepřevýšily 10% (Kula a kol., 2004a).

Analyzátor AxSYM

hodnoty CV pro kontrolní vzorky dosahovaly hodnot pod 4,2%, hodnoty vzorků sér dosahovaly hodnoty pod 7,5%, s výjimkou CA 125, kde v nejnižší koncentraci se CV rovnala 10,3% (Kula a kol., 2004b).

Analyzátor Architect

hodnoty CV pro kontrolní vzorky dosahovaly maximální hodnoty 4,5%, CV pro vzorky sér maxima 10% (Kula a kol., 2004c).

Tabulka 1 : Výsledky CV % kontrolních vzorků.

| Metoda | Low (CV%) | | | Med (CV%) | | | High (CV%) | | |
|-------------|-----------|-----------|------|-----------|-----------|------|------------|-----------|------|
| | IMx | AxSY M | ARCH | IMx | AxSY M | ARCH | IMx | AxSY M | ARCH |
| AFP | 2,2 | 2,4 | 3,2 | 2,8 | 2,4 | 3,7 | 2,3 | 2,1 | 2,3 |
| CEA | 3,7 | 3,4 | 3,2 | 2,6 | 2,7 | 2,4 | 3,1 | 3,0 | 2,2 |
| CA 19.9 | 3,4 | 3,4 | 3,0 | 3,5 | 3,0 | 2,5 | 3,5 | 3,2 | 2,8 |
| Free PSA | 2,2 | 2,8 | 2,1 | 2,3 | 2,6 | 1,8 | 2,4 | 2,7 | 2,6 |
| Tot. PSA | 2,7 | 2,9 | 4,5 | – | 2,1 | 2,7 | – | 2,3 | 2,4 |
| CA 125 | 3,5 | 3,0 | – | 2,7 | 2,5 | – | 3,1 | 3,2 | – |
| CA 15.3 | 4,9 | 4,1 | – | – | – | – | 3,4 | 4,0 | – |
| SCC | 4,4 | – | – | 4,5 | – | – | 4,7 | – | – |

Tabulka 2 : Výsledky CV % vzorků sér.

| Metoda | Nízká hodnota (CV%) | | | Střední hodnota (CV%) | | | Vysoká hodnota (CV%) | | |
|----------|---------------------|-----------|------|-----------------------|-----------|------|----------------------|-----------|------|
| | IMx | AxSY M | ARCH | IMx | AxSY M | ARCH | IMx | AxSY M | ARCH |
| AFP | 2,9;2,3 | 1,7;2,0 | 6,5 | 2,2 | 1,6 | – | 3,3;3,8 | 2,6;2,4 | 3,0 |
| CEA | 4,3;4,4 | 2,8;3,4 | 3,9 | 3,4;3,6 | 2,6;3,5 | 4,1 | 2,7;2,8 | 2,8;2,6 | 4,1 |
| CA 19.9 | 4,8 | 4,5 | 10,0 | 4,8 | 5,2 | 4,6 | 4,6 | 4,8 | 5,4 |
| Free PSA | 7,1 | 3,7 | 5,8 | 3,1 | 3,4 | 5,6 | 4,8 | 4,9 | 7,1 |
| Tot. PSA | 5,1 | 7,4;6,6 | 4,1 | 3,8 | 2,4 | 4,8 | 4,7 | 2,9 | 3,8 |
| CA 125 | 9,6 | 10,3 | – | 4,7 | 5,8 | – | 5,9 | 4,7 | – |
| CA 15.3 | 4,9 | 3,5 | – | 4,6 | 4,2 | – | 3,3 | 4,4 | – |
| SCC | 6,5 | – | – | 5,2 | – | – | 7,9 | – | – |

(Kula a kol., 2004a,b,c)

3.3.4.2 Srovnání korelace

Srovnání stanovení CA 15-3

V této studii autoři hodnotili reprodukovatelnost, analytickou senzitivitu a korelaci metody CA 15-3 mezi analyzátory IMx a CIS ELSA RIA. Korelaci posoudili autoři zhodnocením výsledků ze 209 vzorků sér od zdravých žen a pacientů s benigním a maligním onemocněním. Celkovou korelaci obou systémů ohodnotili jako velmi dobrou se shodou 91%.

Celková korelace v rozmezí 0-5000 U/ml $r = 0,998$

Korelace ve významném dynamickém rozmezí 0-200 U/mn $r = 0,964$

(Martin a kol., 1996).

Srovnání stanovení AFP, CEA, CA 15-3, CA 125, PSA

Ve své studii autoři hodnotili reprodukovatelnost, senzitivitu a korelaci metod stanovení nádorových markerů mezi analyzátory AxSYM a DPC Immulite. Obě metody používaly protilátky podobné. Reagencie analyzátoru AxSYM pro stanovení CA 15-3 a CA 125 obsahovala originální protilátky, oproti reagentům Immulite, které obsahovala vlastní protilátky detekující pouze část nádorového antigenu. Celkovou korelaci při měření vzorků pacientů hodnotili autoři jako dobrou. Nižší hodnotu korelačního koeficientu u CA 15-3 a CA 125 způsobilo použití odlišných protilátek.

Korelace AFP $r = 0,995$

Korelace CEA $r = 0,942$

Korelace CA 15-3 $r = 0,912$

Korelace CA 125 $r = 0,903$

Korelace PSA $r = 0,965$

(Costongs a Bas, 1996).

Srovnání stanovení CEA, AFP, PSA, CA 125

Autoři této studie srovnali provedení a korelaci testů nádorových markerů mezi analyzátory AxSYM a Cobas Core Roche s použitím vzorků pacientů. Autoři zhodnotili korelaci mezi metodami jako dobrou.

| | |
|-----------------|-------------|
| Korelace CEA | $r = 0,965$ |
| Korelace AFP | $r = 1,000$ |
| Korelace PSA | $r = 0,969$ |
| Korelace CA 125 | $r = 0,990$ |

(Forster, Molina, 1996)

Srovnání stanovení CA 125 a CA 15-3

Autoři dvou studií srovnali korelaci stanovení CA 125 (Hofler a kol., 2004a) a CA 15-3 (Hofler a kol., 2004b) ve vzorcích sér mezi analyzátory Architect a AxSYM. Vzájemnou korelaci metod zhodnotili jako velmi dobrou, což usnadňuje přechod ke stanovení analyzátozem Architect.

| | |
|------------------|-------------------------------------|
| Korelace CA 125 | $r = 0,985$ (Hofler a kol., 2004a) |
| Korelace CA 15-3 | $r = 0,9802$ (Hofler a kol., 2004b) |

3.3.4.3 Interference

Lidské anti-myší protilátky (HAMA) mohou být přítomné v lidské krvi jako odpověď organismu na vystavení myším antigenům, nebo jsou součástí léků podávaných u onkologické léčby. Vzorky obsahující HAMA způsobují nejčastěji interference u sendvičových metod, které používají myší monoklonální protilátky.

HAMA způsobují :

falešnou pozitivitu – HAMA se mohou vázat na protilátky ukotvené na pevné fázi a také na protilátky značené. Vzniklý sendvič poskytuje signál pro detekci, aniž by byl ve vzorku přítomen stanovovaný antigen.

falešnou negativitu – HAMA se mohou vázat a blokovat vazebná místa protilátek na pevné fázi i značených protilátek a znemožní tak tvorbu sendviče se stanovovaným antigenem.

Výrobci používají k minimalizaci vlivu HAMA dvoukrokové metody, při níž interferující HAMA jsou promytím odstraněny, nebo používají blokátory k obsazení vazebných míst na HAMA.

Heterofilní protilátky jsou namířeny proti antigenům jiných druhů, např. zvířecí erytrocyty a sérum, kterým můžou být lidé vystaveni při očkování, při chovu zvířat, nebo při kontaktu se zvířecími chlupy, apod. Heterofilní protilátky interfe-

rují stejným způsobem jako HAMA a eliminace se provádí stejnými technikami. Setkáme-li se s neočekávanými či nevěrohodnými výsledky testů, které jsou v rozporu s ostatními klinickými a laboratorními výsledky, musíme uvažovat o přítomnosti heterofilních protilátek.

Tzv. „prozona fenomén“ je efekt projevující se u vysokých koncentrací stanoveného antigenu ve vzorku. Antigen vysytí všechna dostupná vazebná místa na protilátkách. Za těchto podmínek je zabráněno tvorbě sendviče a měřená hladina antigenu může být výrazně nižší, než je skutečná koncentrace ve vzorku. Na křivce závislosti koncentrace a signálu je pozorováno zakřivení směrem dolů k ose koncentrace. Tento jev se velmi často vyskytuje u jednokrokových sendvičových testů. Falešné negativitě zabraňují dvoukrokové formáty testů s promývacími kroky (Anonym 5, 2008).

3.3.4.4 Nejdůležitější zásady pro laboratorní stanovení nádorových markerů

Pro výběr optimální metody stanovení nádorových markerů jsou důležité parametry - spolehlivost, přesnost, správnost, detekční limit, použitelné rozmezí koncentrací i specifita protilátek. Roli ve výběru metody hraje také možnost automatizace, stabilita reagensů, stabilní kalibrace, doba a cena stanovení. Pro standardní materiály v komerčních soupravách neexistují většinou WHO standardy. V rámci vnitřní kontroly správnosti jsou obvykle sledovány dvě hladiny hodnot, fyziologické a patologické. Spolehlivost metody je také možno sledovat podle mediánu hodnot souboru nemocných v určitém období.

Pro správnou interpretaci je důležité vyloučit chyby preanalytické fáze. Dodržování zásad správné laboratorní práce patří mezi nejdůležitější faktory. Nezbytnou nutností je nestřídat diagnostické soupravy od různých výrobců pro daný marker z důvodu dlouhodobého sledování. Je potřeba vzít v úvahu možnost falešně pozitivních výsledků u nemaligních onemocnění a poruch vylučování nádorových markerů při nedostatečné funkci jater a ledvin. Pro hodnocení nádorových markerů je nutná spolupráce laboratoře a klinického lékaře (Nekulová a kol., 2006).

Při zpracování této práce jsem použila knižní literární zdroje, Internetové stránky a vyhledávač google.com, kde jsem k vyhledávání informací použila klíčová slova nádor, nádorové (tumor) markery, imunochemické metody, Abbott, Roche, DRG, Immunotech.

4 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zpracovat přehled nádorových markerů používaných v klinické praxi a jejich detekci imunochemickými metodami.

Literární přehled jsme rozčlenili do tří hlavních celků – nádorová onemocnění, nádorové markery a laboratorní stanovení. V kapitole nádorová onemocnění je objasněna definice nádorového onemocnění jako patologického stavu, hlavní stadia procesu kancerogeneze a vnější i vnitřní faktory podílející se na poškození genetické výbavy buňky, vzniku onkogenů a inaktivace antionkogenů, které vedou k maligní transformaci buněk.

Kapitola nádorové markery shrnuje definici a rozdělení nádorových markerů podle povahy. Popsali jsme kriteria, která by měl splňovat ideální marker, čehož nebylo zatím v praxi dosaženo. Tato část vysvětluje pojmy rozhodovací hranice „cut off“, diagnostická senzitivita a specifita, pozitivní a negativní predikční hodnota a způsob sestavení a hodnocení ROC křivky. Praktické využití nádorových markerů spočívá především v monitorování efektu onkologické terapie. Správná klinická aplikace je obsažena v požadavcích na kvalitu stanovení nádorových markerů v preanalytické, analytické a postanalytické fázi, které doporučují mezinárodní pracovní skupiny EGTM. Další část kapitoly je věnována přehledu nejčastěji stanovovaných markerů, jejich charakteristice, produkci za fyziologického a patologického stavu a význam jejich stanovení v závislosti na typu a lokalizaci nádorového onemocnění.

V kapitole laboratorní stanovení nádorových markerů jsme se soustředili na popis imunochemických metod, kterými je možné nádorové markery detekovat a stanovit jejich koncentraci v biologickém materiálu. Část této kapitoly jsme zaměřili na popis struktury Ig a způsob získávání monoklonálních protilátek metodou hybridomové technologie. Obecně jsou imunoanalytické metody děleny podle uspořádání na homogenní, heterogenní, kompetitivní a nekompetitivní. Detekce vznikajících imunokomplexů je umožněna značením antigenu, nebo protilátky, a podle druhu značky jsou metody děleny na EIA, RIA, LIA a FIA. Následují příklady a popis technologií, které se v současné době používají pro stanovení nádorových markerů a umožňují specifické a vysoce citlivé vyšetření.

Uvedli jsme příklady srovnání přesnosti metod a reagenčních šarží, které podávají informaci o spolehlivosti výsledků. Kvalitní laboratorní diagnostika má význam pro klinické zhodnocení a přispívá k posunu diagnostiky a léčby zhoubných nádorů na vyšší úroveň.

Rozsah práce je v souladu se zadáním a vytyčené cíle jsme splnili.

5 SOUHRN

Záměrem práce bylo vypracovat shrnutí problematiky významu nádorových markerů a jejich laboratorního stanovení. Tyto markery umožňují získat přínosné informace pro komplikovanou diagnostiku a terapii nádorových onemocnění, na jejichž vzniku se podílejí zevní i vnitřní příčiny způsobující změny v genetické výbavě buněk nebo jejím přepisu. Přehled jednotlivých nádorových markerů shrnuje jejich charakteristiku a hlavní význam stanovení v závislosti na typu nádoru.

Svou pozornost jsme zaměřili především na laboratorní stanovení hladin nádorových markerů využívající imunochemické reakce. Základem imunochemických reakcí je vzájemná reakce antigenu a protilátky (většinou monoklonální). Imunoanalytické metody jsme dělili podle uspořádání a způsobu značení reagujících složek. V praxi používané laboratorní analyzátory využívají ke stanovení koncentrace nádorových markerů moderní technologie, které umožňují citlivou detekci a zvyšují kvalitu laboratorního stanovení.

Do problematiky využití stanovení nádorových markerů v klinické praxi patří také požadavky správné laboratorní praxe, vhodné rozhodovací hranice „cut off“, určení pozitivní a negativní predikční hodnoty a vyjádření vzájemného vztahu diagnostické senzitivity a specifity ROC křivkou. Kritické posouzení přístrojového a metodického zázemí výrazně přispívá k reprodukovatelnosti výsledků a srovnatelnosti výsledků mezi jednotlivými diagnostickými metodami a pracovišti.

6 SEZNAM ZKRATEK

| | |
|------------------|--|
| ACTH | adrenokortikotropní hormon |
| ADH | antidiuretický hormon |
| AFP | α -fetoprotein |
| AUC | plocha pod křivkou |
| B ₂ M | β_2 -mikroglobulin |
| CA | carbohydrate antigen |
| CASA | s nádorem asociovaný sérový antigen |
| CDR | komplementaritu určující oblast |
| CEA | karcinoembryonální antigen |
| CgA | chromogranin A |
| CIC | cirkulující imunokomplexy |
| CLIA | chemiluminiscenční imunoanalýza |
| CMIA | chemiluminiscenční magnetická imunoanalýza |
| CMV | cytomegalovirus |
| CNS | centrální nervový systém |
| CT | kalcitonin |
| CV | variační koeficient |
| CYFRA 21-1 | fragment cytokeratinu 19 |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| ECL | elektrochemiluminiscence |
| ECLIA | elektrochemiluminiscenční imunoanalýza |
| EDTA | ethylendiamin-tetraoctová kyselina |
| EGMT | European Group on Tumor Markers |
| EIA | enzymoimunoanalýza |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| FER | ferritin |
| FIA | fluoroimunoanalýza |
| FPIA | fluorescenční polarizační imunoanalýza |
| FSH | folikulostimulační hormon |
| GH | růstový hormon |

| | |
|------------|---|
| GIT | gastrointestinální trakt |
| HAMA | lidské anti-myší protilátky |
| HCG | choriogonadotropin |
| HIOK | kyselina hydroxyindolactová |
| Ig | imunoglobulin |
| IRMA | imunoradiometrická analýza |
| LASA | lipidově vázaná sialová kyselina |
| LD | laktátdehydrogenáza |
| LH | luteinizační hormon |
| MCA | antigen mucinózních karcinomů |
| MEIA | enzymová imunoanalýza na mikročásticích |
| MEL | melanogeny |
| MU | 4-methylumbelliferon |
| MUP | 4-methylumbelliferylfosfát |
| mRNA | mediátorová ribonukleová kyselina |
| MSA | mammární sérový antigen |
| NMP-22 | proteiny nukleární matrix |
| NSE | neuron-specifická enoláza |
| PAP(ACP-P) | prostatická frakce kyselých fosfatázy |
| PLAP | placentární alkalická fosfatáza |
| PRL | prolaktin |
| PSA | prostatický specifický antigen |
| PTH | parathormon |
| r | korelační koeficient |
| RAF | reaktanty akutní fáze |
| RIA | radioimunoanalýza |
| ROC-křivka | rozlišovací operační křivka |
| SCC | antigen skvamózních buněk |
| SD | směrodatná odchylka |
| SP 1 | β_1 -specifický glykoprotein |
| TAA | tumor-asociovaný antigen |
| TATI | s tumorem asociovaný trypsin-inhibitor |
| TG | tyreoglobulin |

| | |
|---------------------|--|
| TK | tymidinkináza |
| TM ₂ -PK | nádorový izoenzym pyruvátkinázy |
| TPA | tripropylamin |
| TPA | tkáňový polypeptidový antigen |
| TPS | tkáňový polypeptidový antigen specifický |
| TSA | tumor-specifický antigen |
| TSH | tyreotropní hormon |
| UGP | močový gonadotropinový peptid |
| VMK | kyselina vanilmandlová |
| WHO | Světová zdravotnická organizace |

7 SEZNAM LITERATURY

- Abbott Laboratories : Uživatelská příručka AXSYM, únor 2004, B9F267, 36-5130/R1, s. 3-3 – 3-31
- Abbott Laboratories : Uživatelská příručka ARCHITECT, únor 2005, B3M427, 36-5131/R1, s.3-25 – 3-45
- ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. : Základy buněčné biologie. Espero Publishing, Ústí nad Labem, 1998, s.506, 582, 588-589, 619, 621, ISBN 80-902906-0-4
- ANONYM 1 : World Health Organisation, 27.1. 2008.
<http://www.who.int/cancer/en/>.
- ANONYM 2 : World Health Organisation, 27.1.2008.
<http://who.int/infobase/report.aspx?rid=126>
- ANONYM 3 : Zemřelí v České republice v roce 2006, Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. 27.1. 2008
http://www.uzis.cz/news.php?mnu_id=1100&archiv=1
- ANONYM 4 : Imunochemické metody, 22.8.2007
<http://che1.lf1.cuni.cz/html/imuno.pdf>
- ANONYM 5 :
http://www.abbottdiagnostics.com/Science/Educational_Materials.cfm
16.2.2008
- ANONYM 6 :
http://www.roche-diagnostics.cz/pages/cent/uvod_imunoanalyza.asp
16.2.2008
- ANONYM 7 :
http://www.immunotech.cz/products_imch_soupravy.htm, 17.2. 2008
- ANONYM 8 : <http://www.drg-international.com/servlet/public/catalog/DRG.html>
17.2.2008
- COSTONGS, G.M.P.J., BAS, B.M. : Evaluation of Abbott AxSYM and DPC Immulite: Performance Characteristics of AFP, CEA, CA 15-3, CA 125 and PSA Assay. AXSYM Tumor Markers, Abbott Diagnostics Division, 1996.
- DANAEI, G., VANDER HOORN, S., LOPEZ, AD., MURRAY, CJ., EZZATI, M. : Comparative Risk Assessment collaborating group (Cancer). Causes of

- cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*. 2005; 366: 1784-93.
- DOLEŽALOVÁ, V. a kol. : *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii*. 4. vydání. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, Brno, 1995, s. 60-67, 220-240, ISBN 80-7013-198-5
- FORSTER, E.L., MOLINA, R. : Comparison of the Performance of the AxSYM and Cobas Core Cancer Assay. *AXSYM Tumor Markers*, Abbott Diagnostics Division, 1996.
- HATINA, J. : *Imunologie nádorů – současný stav a poznatky z 1. mezinárodní konference základní a klinické imunogenomiky. Část 1 – Interakce nádoru a imunitního systému*. *Klinická onkologie*, roč.18, 4, 2005, s. 119-125
- HOFLER, J.G., KETTLETY, T.R., WOLANIUK, D.L., SMITH, S.B., SCHMID, E.M., SMITH, G.A., COVERT, W.E., ROSIERE, T.K. : ARCHITECT CA 125 II : A Chemiluminescent Microparticle Assay for the ARCHITECT Instrument System. Fujirebio Diagnostics Inc, Malvern, 2004a.
- HOFLER, J.G., KETTLETY, T.R., WOLANIUK, D.L., SMITH, S.B., SCHMID, E.M., SMITH, G.A., COVERT, W.E., FRIESE, J.A. : ARCHITECT CA 15-3, A Chemiluminescent Assay. Fujirebio Diagnostics Inc, Malvern, 2004b.
- KLENER, P., MALBOHAN, I. M., ZIMA, T. : *Nádorové markery*. In: Zima, T. a kol. : *Laboratorní diagnostika*. 1. vydání. Galén, Praha, 2002, s. 331-332, ISBN 80-7262 201-3
- KREJSEK, J., KOPECKÝ, O. : *Klinická imunologie*. 1. vydání. Nucleus, HK, 2004, s.87-89, 257-260, 541-550, 558-560, 871-874, ISBN 80-86225-50-X
- KULA, K., PFEIFFER, Z., RODRIGUEZ, K., RIOS, A., SALAS, J., MORISHIMA, E. : Consistent Lot-to-Lot performance for Patient Monitoring Using Abbott Imx Tumor Markers Assay. Abbott Laboratories, 2004a.
- KULA, K., MORGAN, N., PFEIFFER, Z. : Abbott Architect Tumor Marker Assays: Lot-to-Lot Consistency for Patient Monitoring. Abbott Laboratories, 2004c.
- KULA, K., EVERS, B., PFEIFFER, Z., RIOS, A., MORISHIMA, E. : Abbott AxSYM Tumor Markers Assay: Consistency in Patient Monitoring. Abbott Laboratories, 2004b.

- MARTIN, P.M., ROMAIN, S., PICHON, M.F. : Comparison of the IMx CA 15-3 Assay with the CIS ELSA CA 15-3 RIA. Breast Cancer and CA 15-3, Abbott Diagnostics Division, 1996.
- MASOPUST, J. : Klinická biochemie požadování a hodnocení biochemických vyšetření, část II. 1. vydání. Karolinum, Praha, 1998, s. 573-575, 577, 581, 589-592, 594, 597-601, ISBN 80-7184-649-X
- MASOPUST, J. : Nádorové markery včera, dnes a zítra, 1. část. Labor Aktuell, 2004a, 2, s.4-8
- MASOPUST, J. : Nádorové markery včera, dnes a zítra, 2. část. Labor Aktuell, 2004b, 3, s.7-9
- MASOPUST, J. : Nádorové markery včera, dnes a zítra, 3. část. Labor Aktuell, 2004c, 4, s.4-9
- NEKULOVÁ, M., ŠIMÍČKOVÁ, M.,: Nádorové markery. In: Schneiderka, P. a kol. : Kapitoly z klinické biochemie. 1. vydání. Karolinum, Praha, 2000, s. 196, ISBN 80-246-0140-0
- NEKULOVÁ, M., ŠIMÍČKOVÁ, M., VALÍK, D. : Nádorové markery a epigenetické faktory . Klinická biochemie a metabolismus, 14, 2006, 3, s.152-156
- RACEK, J. et al. : Klinická biochemie. 2. vydání. Galén, Praha, 2006, s.33-39, 41-43, 247-249, ISBN 80-7262-324-9
- ŘÍHOVÁ, B. : Protinádorová imunita a cílená terapie. In: Tlaskalová-Hogenová, H., Holáň, V., Bilej, M. (Eds.) : Buněčné a molekulární základy imunologie. Česká imunologická společnost, Praha, 2007, s. 169-173
- ŠIMÍČKOVÁ, M. : Doporučení pro vyšetřování nádorových markerů : European Group on Tumor Markers (EGTM) 1999. Labor Aktuell, 2001b, 3, s.4-7
- ŠIMÍČKOVÁ, M., NEKULOVÁ, M. : Nádorové markery. Roche s.r.o. Diagnostics Division, 2004
- ŠIMÍČKOVÁ, M., NEKULOVÁ, M., ČERNOCH, M., VALÍK, D. : Nádorové markery. Roche s.r.o. Diagnostics Division, 2001a, 64 s.
- ŠMARDA, J., ŠMARDOVÁ, J. : Jak vznikají nádory? Universitas revue Masarykovy univerzity v Brně, 22.8.2007.
http://universitas.muni.cz/2005_4/smarดา.html
- ZIMA, T., KALOUSOVÁ, M., MALBOHAN, I. : Laboratorní vyšetření u nádorových onemocnění. Zdravcentra.cz, Zentiva a.s., 10.9.2007.
http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/6932_1431.html

Obrázek 1,2: http://ukb.lf1.cuni.cz/ppt/tum_mark/frame.htm , 3.3.2008

Obrázek 3,4,5,6 :

http://www.abbottdiagnostics.com/Science/Educational_Materials.cfm

3.3.2008.

Obrázek 7: http://www.roche-diagnostics.cz/pages/cent/uvod_imunoanalyza.asp

3.3.2008.

Obrázek 8: http://www.immunotech.cz/cz_b2-Microglobulin.htm, 3.3.2008.

