

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

NÁDOROVÉ MARKERY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

HRADEC KRÁLOVÉ, 2009

SIMONA KARMAZÍNOVÁ

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Nádorové markery

Diplomová práce

Vedoucí práce: Prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

Odborný konzultant: Prof. RNDr. Miloš Tichý, CSc.

Hradec Králové, 2009

Simona Karmazínová

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Nádorové markery zpracovala samostatně a s použitím uvedené literatury.

V Hradci Králové dne 10.6.2009

Simona Karmazínová

Poděkování:

Ráda bych vyjádřila díky všem, kteří mi při zpracování diplomové práce pomáhali.

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Prof. MUDr. Jaroslavu Dršatovi, CSc., za odborné vedení a vstřícný a profesionální přístup.

Poděkování patří i Prof. RNDr. Miloši Tichému, CSc., za cenné připomínky, podporu, ochotu a odbornou pomoc v průběhu zpracování celé diplomové práce.

OBSAH

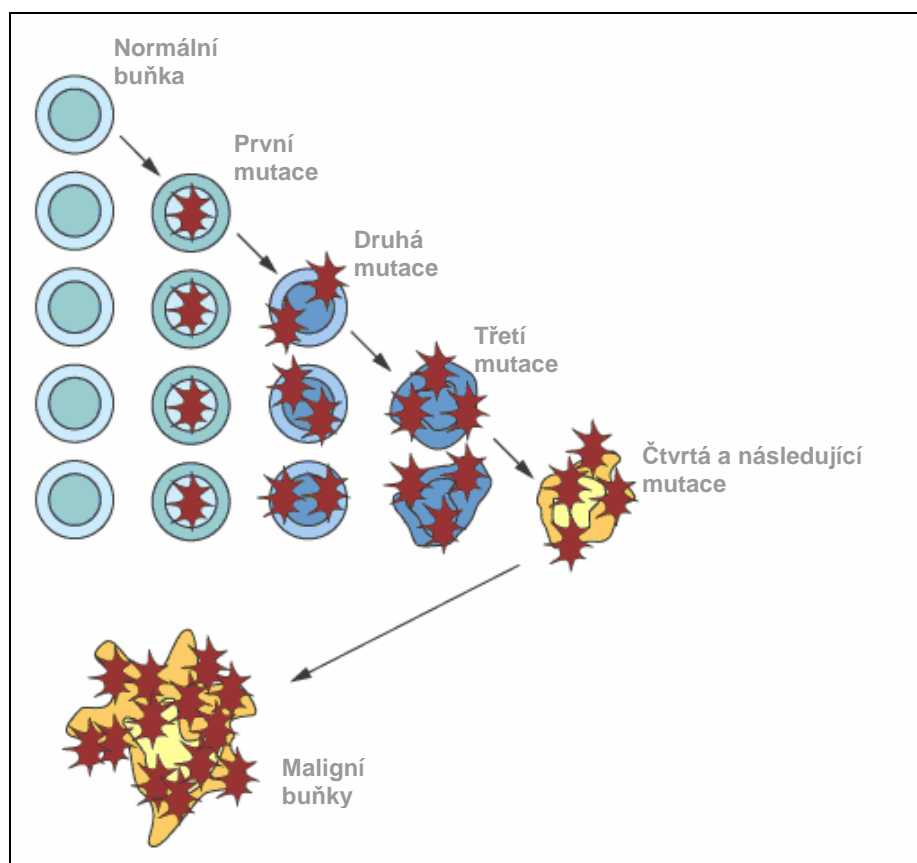
OBSAH.....	5
1. ÚVOD.....	7
2. NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ DNES.....	9
2.1 Nejčastější nádorová onemocnění.....	13
2.1.1 Karcinom plic.....	13
2.1.2 Karcinom prsu.....	15
2.1.3 Karcinom žaludku.....	17
2.1.4 Kolorektální karcinom.....	19
2.1.5 Karcinom jater.....	22
2.1.6 Karcinom čípku děložního.....	23
2.1.7 Karcinom prostaty.....	25
3. NÁDOROVÉ MARKERY.....	27
3.1 Onkofetální antigeny.....	29
3.1.1 Alfa-fetoprotein (AFP).....	29
3.1.2 Karcinoembryonální antigen (CEA).....	33
3.1.3 Lidský choriogonadotropin (hCG).....	36
3.2 Tkáňově či orgánově specifické antigeny.....	38
3.2.1 Prostatický specifický antigen (PSA).....	38
3.2.2 Neuron specifická enoláza (NSE).....	40
3.2.3 CA 125.....	41
3.2.4 CA 15-3.....	42
3.2.5 CA 19-9.....	44
3.2.6 CA 72-4.....	45
3.3 Nespecifické antigeny a tumorové markery.....	46
3.3.1 Ferritin.....	46
3.3.2 Beta ₂ -mikroglobulin (β ₂ -M).....	48
3.3.3 Laktátdehydrogenáza (LD).....	49
4. METODY STANOVENÍ NÁDOROVÝCH MARKERŮ.....	51
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	53
5.1 Onkofetální antigeny.....	54

5.1.1 Stanovení koncentrace AFP v séru imunochemicky (CLIA) na analyzátoru immulite 2000.....	54
5.2 Tkáňově či orgánově specifické antigeny.....	64
5.2.1 Stanovení koncentrace celkového PSA v séru imunochemicky (CLIA) na analyzátoru Immulite 2000.....	64
5.2.2 Stanovení koncentrace CA125 v séru imunochemicky (CLIA) na analyzátoru Immulite 2000.....	71
5.3 Nespecifické antigeny a tumorové markery.....	78
5.3.1 Stanovení koncentrace ferritinu v séru imunochemicky (CLIA) na analyzátoru Immulite 2000.....	78
5.3.2 Kvantitativní stanovení aktivity LD v séru kinetickým UV fotometrickým testem soupravou LD (IFCC/GSCC 94) OSR 6128 Olympus Diagnostica na analyzátoru Olympus AU 400.....	84
6. ZÁVĚR.....	94
7. SEZNAM ZKRATEK.....	97
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	99

1. ÚVOD

Když byly v první polovině 20. století v Evropě a Severní Americe zvládnuty nejzávažnější infekční nemoci, objevila se další skupina onemocnění se zdánlivě epidemickým výskytem právě v těchto částech světa. Byla to nádorová onemocnění. V současné době jsou nádorová onemocnění na druhém místě mezi příčinami smrti v průmyslově vyspělých zemích. Na časté snahy řadit je k tzv. civilizačním nemocem lze hledět kriticky. Již delší dobu však existuje hypotéza, že zhoubné nádory jsou především nemocí průmyslových zemí a že u primitivních národů se vyskytovaly vzácně [1].

Tělo produkuje celou řadu různých typů buněk. Normální zdravé buňky se dělí a rostou podle potřeb organismu. Někdy se však buňky začínají dělit za vzniku buněk nových i bez potřeby organismu (obr. č. 1). Vzniká tak masa nové tkáně, kterou nazýváme nádorem [2].



Obr. č. 1: Klasické schéma obecně uznávaného vzniku nádoru: Zdravá buňka – vznik první mutace – druhé mutace – třetí a další mutace až dojde ke vzniku zhoubných nádorových buněk (převzato z [3]).

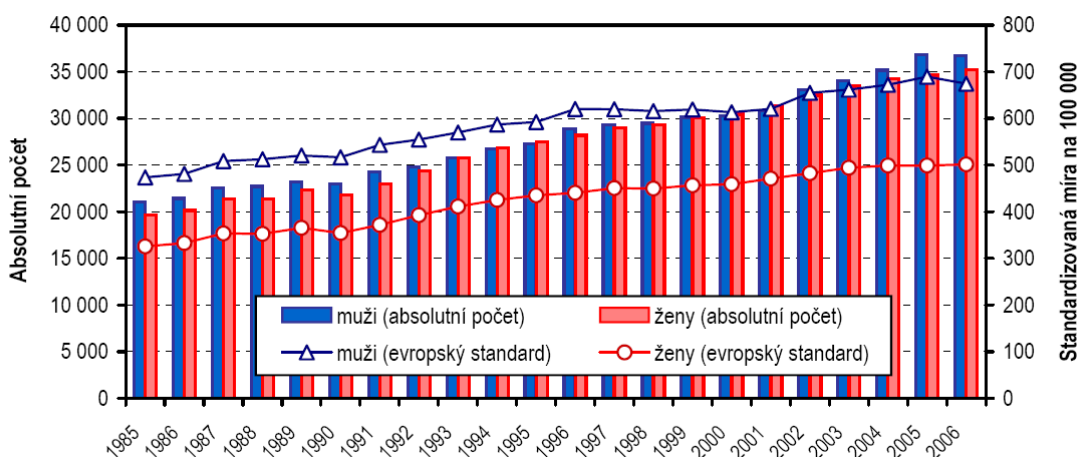
Výskyt jednotlivých typů nádorů je v různých částech světa a u různých etnik odlišný. To mohlo v počátcích výzkumu zavdat příčinu k předpokladu infekčního původu řady nádorů, zejména však jejich genetické determinace (tzv. nádorové rodiny - cancer families). Dnes víme, že hlavní příčinou většiny nádorů bývá kombinace nepříznivých vnitřních faktorů, tj. faktorů geneticky podmíněných a vnějších faktorů, v nichž podstatnou složku kromě expozice člověka karcinogenním látkám (zejména v pracovním prostředí) představuje životní styl. V této souvislosti je třeba připomenout, že jedním z nejdůležitějších rizikových faktorů je věk. S prodlužováním věku roste incidence některých nádorů, dochází ke kumulaci spontánních mutací, ke genetické nestabilitě, čímž se dále zvyšuje riziko výskytu jak spontánních, tak indukovaných mutací [1].

Široce vžitý a stále hojně užívaný pojem rakovina považují onkologové za nešťastný z několika důvodů. Odjakživa ho totiž obklopuje představa nevyhléditelnosti a neodvratné smrti, které předcházejí kruté bolesti a všelijaká jiná utrpení. Ač tomu tak už delší dobu není, obestírá nádorová onemocnění mýtus, jehož vyvrácení je jedním z hlavních, přitom však velmi obtížně řešitelných úkolů onkologů na celém světě. Pojem v sobě navíc zahrnuje několik set onemocnění s rozdílnými vlastnostmi a dopadem na osudy nemocných [2].

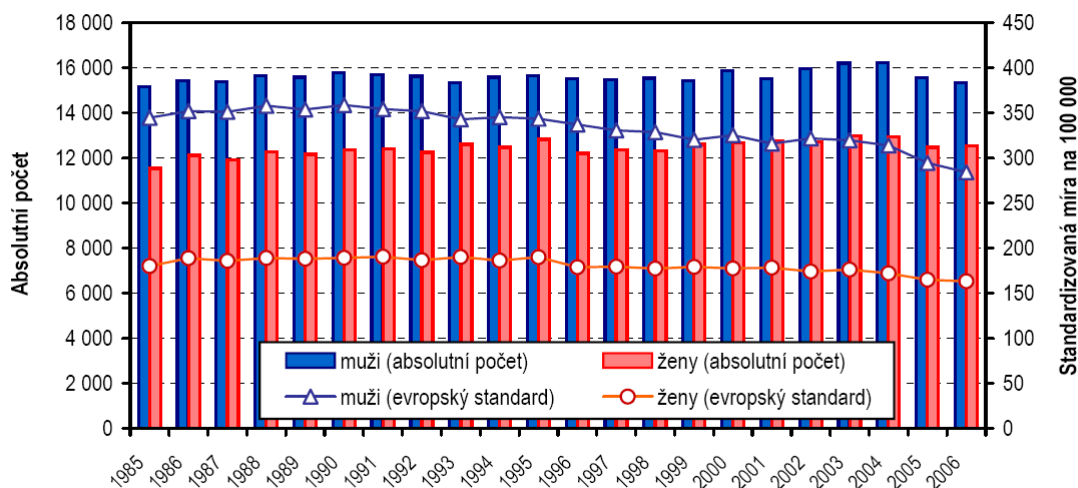
2. NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ DNES

Ze statistik Světové zdravotnické organizace (WHO) vyplývá, že v roce 2000 zemřelo následkem nádorových onemocnění přes 6,2 miliónu osob na celém světě. Ve stejném roce bylo prokázáno přes 10 miliónů nových případů onkologického onemocnění. Na zemi tedy žije celkem 22,4 miliónu osob s různým typem nádorového onemocnění. Odhaduje se, že pokud nedojde k zásadním opatřením v oblasti prevence a léčby, bude kolem roku 2020 umírat deset miliónů lidí ročně na onkologická onemocnění [4]. Dle WHO bude ve vyspělých zemích každý 3. občan postižen onkologickým problémem [5].

V roce 2006 bylo do Národního onkologického registru ČR nově nahlášeno téměř 72 000 případů zhoubných novotvarů a novotvarů in situ, z toho více než polovina případů u mužů. Absolutní počet nově zjištěných nádorů poprvé od roku 1990 meziročně velice nepatrně klesl, a to o méně než 1%. Zatímco incidence novotvarů v ČR v dlouhodobém pohledu roste, úmrtnost na zhoubné nádory vykazuje trend opačný (obr. č. 2. a obr. č. 3). Celkově v roce 2005 zemřelo na zhoubný novotvar téměř 28 000 osob, z toho více než 15 000 mužů. Věkové rozložení hlášených zhoubných nádorů je dlouhodobě stabilní s výraznou koncentrací do vysokých věkových skupin [6].

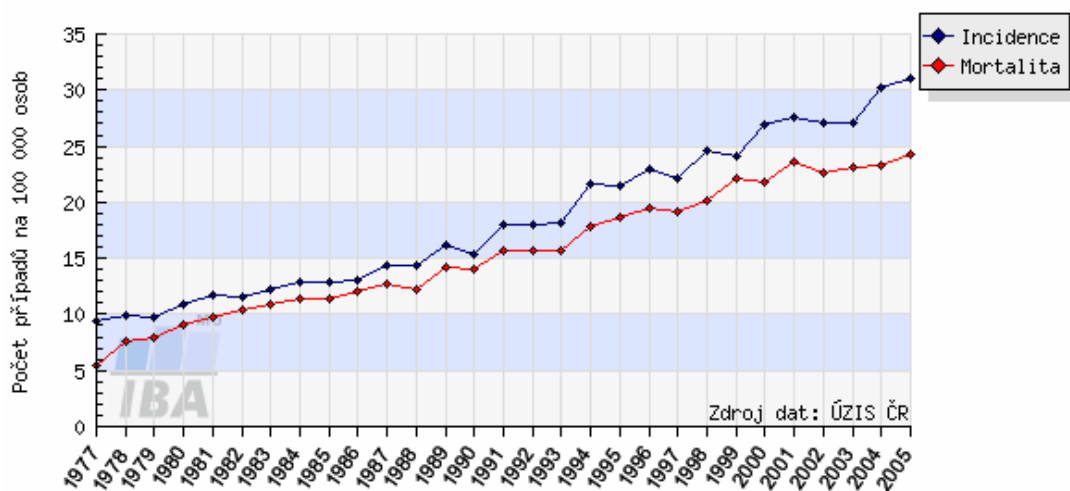


Obr. č. 2: Vývoj incidence zhoubných novotvarů u mužů a žen v ČR (1985 – 2006)
(převzato z [6])



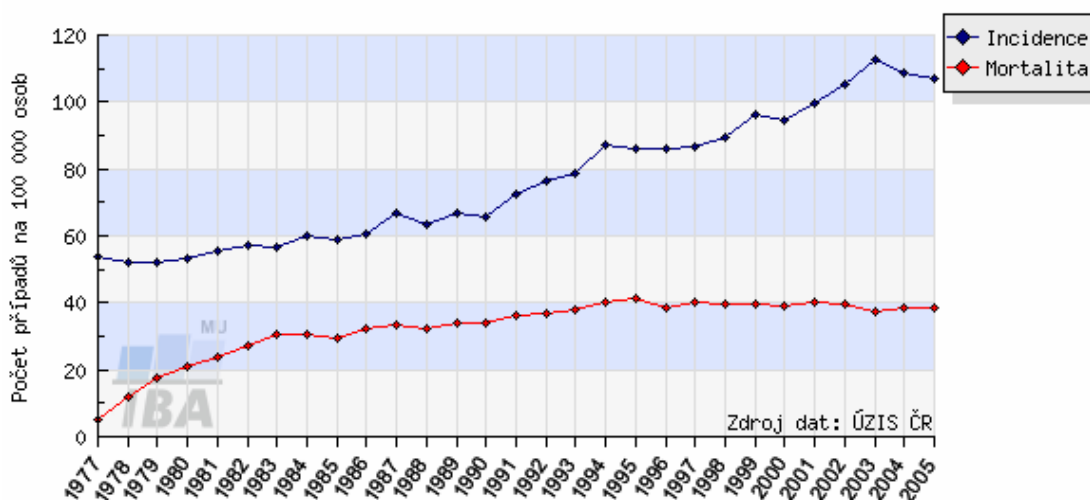
Obr. č. 3: Vývoj úmrtnosti na zhoubné novotvary u mužů a žen v ČR (1985 – 2006) (převzato z [6])

Vyléčit se daří v České republice asi jen 47% (jinde ve světě až 63%) těchto pacientů. Jsme tedy až na 34. místě. Přes vzrůstající incidenci nádorových onemocnění však v rozvinutých zemích mortalita na nádorová onemocnění nestoupá. Výjimku tvoří karcinom plic žen (obr. č. 4).



Obr. č. 4: Graf výskytu karcinomu průdušnice, průdušek a plic u žen v závislosti na čase (převzato z [7])

Zásadní význam v prevenci a včasné diagnostice mají Národní programy screeningu zhoubných nádorů. V ČR se zlepšilo přežívání u karcinomu prsu díky screeningovému mamografickému vyšetřování žen ve věku od 45 do 69 let 1x za 2 roky (obr. č. 5). Dále je zaveden program screeningu kolorektálního karcinomu pro muže a ženy ve věku nad 50 let. Ve věkové skupině 50 – 54 let se provádí test na okultní krvácení 1x ročně, od 55 let věku 1x za 2 roky, nebo primární screeningová kolonoskopie 1x za 10 let. Do Národního programu screeningu zhoubných nádorů v ČR ještě patří program screeningu karcinomu děložního hrdla. Je určen pro ženy ve věku od 15ti let, je plánováno vyšetřování žen ve věku 25 – 60 let. Tato screeningová metoda spočívá v cytologickém vyšetření stěru z děložního hrdla 1x ročně [8].

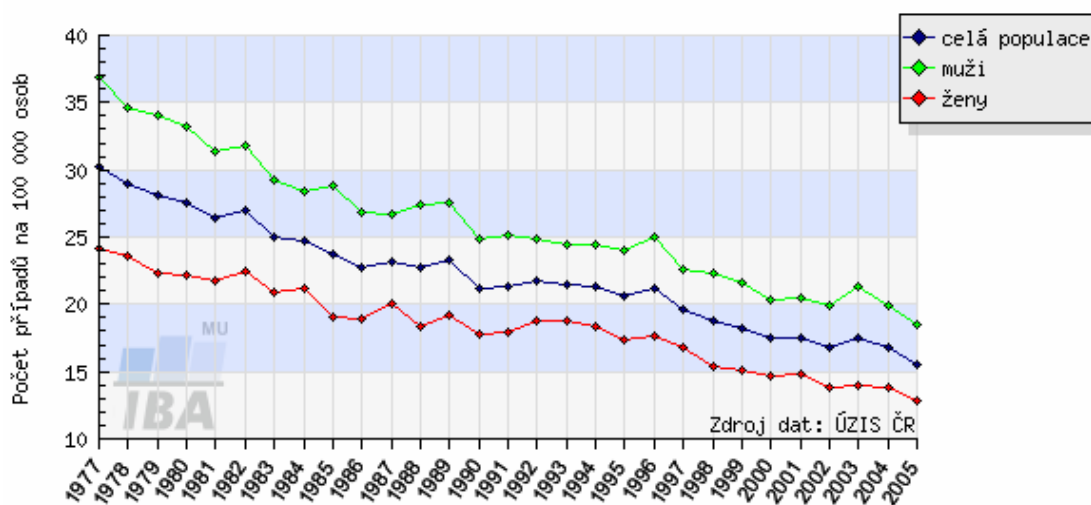


Obr. č. 5: Graf výskytu karcinomu prsu u žen v závislosti na čase (převzato z [7])

V přepočtu na 1 obyvatele na onkologickou terapii připadá v EU asi 3x více financí než v ČR (zde v průměru 1950 Kč ročně). Onkologická terapie takto čerpá 6,5% financí, které jdou do zdravotnictví [5].

Maligní nádory zaujímají mezi ostatními nemocemi mimořádné postavení nejenom pro svůj stále rostoucí výskyt (incidenci), ale i pro náročnou zdravotní péči. V první polovině 90. let 20. století vzrostla v České republice statisticky významně incidence nádorů ledvin, kolorekta, melanomu, žlučníku, žlučových cest, štítné žlázy a močového měchýře; pouze u mužů navíc incidence karcinomu prostaty, jater, varlete a mnohočetného myelomu, jen u žen také

hrtanu, průdušnice a plic, prsu, vaječníku a hodgkinských lymfomů. U obou pohlaví signifikantně poklesla incidence nádoru žaludku (obr. č. 6) [9].



Obr. č. 6: Graf výskytu karcinomu žaludku u mužů a žen v závislosti na čase (převzato z [7]).

Znalosti o prevenci a léčbě onkologických onemocnění se v posledních letech podstatně prohloubily. S růstem počtu obyvatel této planety a prodlužující se délkou života se však zvyšuje i počet nádorových onemocnění, která jsou každoročně prokázána. Jsou tudíž na předním místě příčin úmrtí ve vyspělých i rozvojových zemích, což celosvětově představuje 12,6% úmrtí [4].

WHO uvádí, že mezi nejčastější celosvětově se vyskytující nádorová onemocnění patří nádory plic, prsu a tlustého střeva. Nejčastější nádorová onemocnění končící smrtí jsou pak nádory plic, žaludku a jater. Nejčastějšími nádory u mužů v rozvinutých zemích jsou nádory plic, prostaty a tlustého střeva, zatímco v rozvojových zemích následují po nádorech plic nádory žaludku a jater. U žen jsou ve vyspělých zemích nejčastějšími nádory prsu, tlustého střeva a plic, zatímco v rozvojových zemích jsou to nádory prsu, gynekologické nádory a nádory žaludku [4].

Za zvyšující se počet nádorových onemocnění si částečně můžeme sami. Kolem 43% úmrtí na nádorová onemocnění je podmíněno kouřením, nesprávnými stravovacími návyky a infekcemi [4].

Česká onkologická společnost ČLS JEP buduje informační systém, který kombinací klinických a populačních registrů pokrývá hlavní oblasti hodnocení léčebné péče. Dostupná data dokládají vysokou zátěž české populace zhoubnými nádory a s ní související růst nákladů na léčbu [8].

2.1 Nejčastější nádorová onemocnění

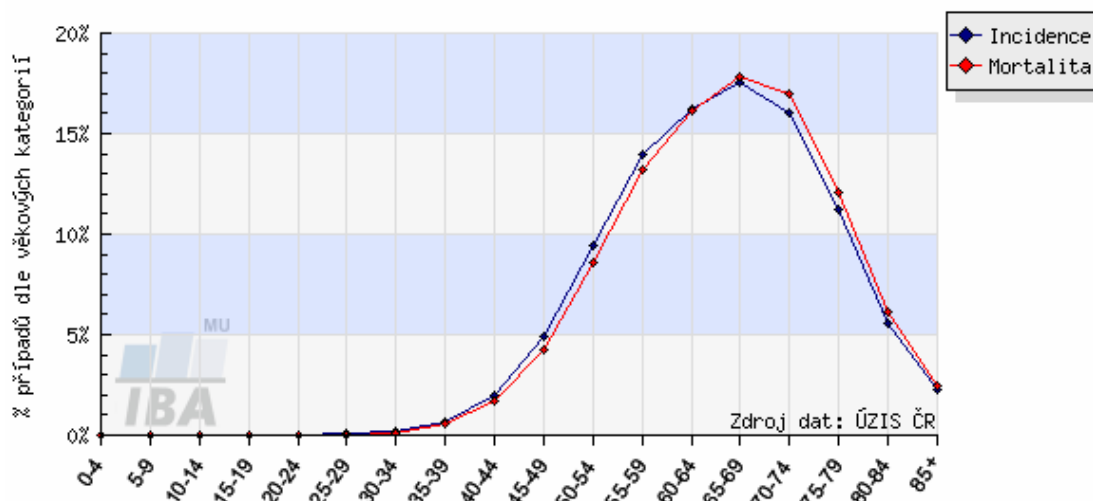
V této kapitole charakterizují nejčastěji se vyskytující typy nádorových onemocnění, představující téměř polovinu všech nově diagnostikovaných nádorů ve světě za rok. Jsou jimi karcinom plic, prsu, žaludku, kolorektální karcinom, karcinom jater, čípku děložního a karcinom prostaty.

2.1.1 Karcinom plic

Celosvětově nejčastějším nádorem je karcinom plic, v minulosti typický nádor vyššího věku. Bohužel díky kouření se jeho výskyt posunuje do nižších věkových skupin. V roce 2000 se na výskytu nových nádorových onemocnění ve světě podílel 12,5% [10].

Je to nádor, který se nejčastěji vyskytuje v mužské populaci. Za posledních 50 let vzrostla jeho incidence ve vyspělých státech téměř 15x. V České republice pozorujeme u mužů výrazně vzestupný trend, na rozdíl od některých jiných států, jako např. USA, kde se (patrně v souvislosti s omezováním spotřeby cigaret) růst jeho incidence zpomalil [1].

Vyskytuje se především ve věku mezi 50 – 80 lety (obr. č. 7) a jde o jednu z nejčastějších smrtících malignit osob západní civilizace. Dělí se na dvě hlavní kategorie – malobuněčný a ne-malobuněčný. Později s rozvojem choroby nacházíme karcinom (Ca) ze squamozních buněk, adenokarcinom a Ca z nediferencovaných velkých buněk. Prognóza závisí na stupni choroby, věku, pohlaví. Kuřáci mají asi 8,8x častěji Ca plic než nekuřáci (u bývalých kuřáků klesá tento násobek asi na 5,5x) [11].



Obr. č. 7: Graf výskytu karcinomu průdušnice, průdušek a plic v závislosti na věkové struktuře populace (převzato z [7])

Až 90% všech nádorů plic nějak souvisí s tabákem, tedy nejenom s kouřením, ale i s tzv. pasivním kouřením, šňupáním nebo žvýkáním tabáku. V zemích s klesající spotřebou cigaret, se s určitým časovým posunem snížil i výskyt karcinomu plic [10].

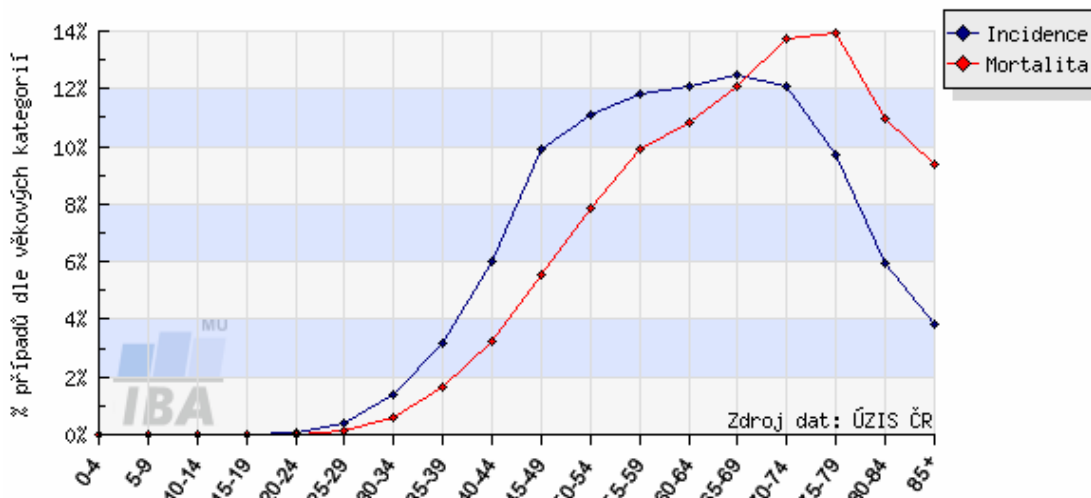
Ačkoliv karcinom plic je absolutně nejčastějším nádorem na světě, neznáme způsob, jak spolehlivě odhalit časná a léčitelná stadia tohoto nádoru. S objevem zdravotních obtíží bývá nádor již rozsáhlý a léčba, především operativní, bývá nemožná nebo její efekt je relativně méně úspěšný. Časná stadia nádorů plic bývají spíše náhodným nálezem při RTG vyšetření plic [10].

Z pohledu vyšetření nádorových markerů je pro odhalení karcinomu plic ideální kombinace CYFRA (nebo TPS) + CEA + NSE (85 – 95%) nebo CYFRA (nebo TPS) + SCC (squamozní bb). Počínající chorobu lze odhalit a následnou terapii můžeme monitorovat pomocí CYFRA, CEA, NSE, SCC nebo TPS [11]. Podrobněji se jednotlivými markery zmíněnými u všech typů nádorových onemocnění zabývá kapitola 3.

V souvislosti s kouřením se hovoří i o dalších nádorech, především o rakovině pankreatu, nádoru dutiny ústní, jícnu, hltanu a hrtanu (u nichž se jako další rizikový faktor připojuje nadměrné požívání koncentrovaných alkoholických nápojů), karcinomu močového měchýře, ledvin a močodů, prostaty a žlučníku [1].

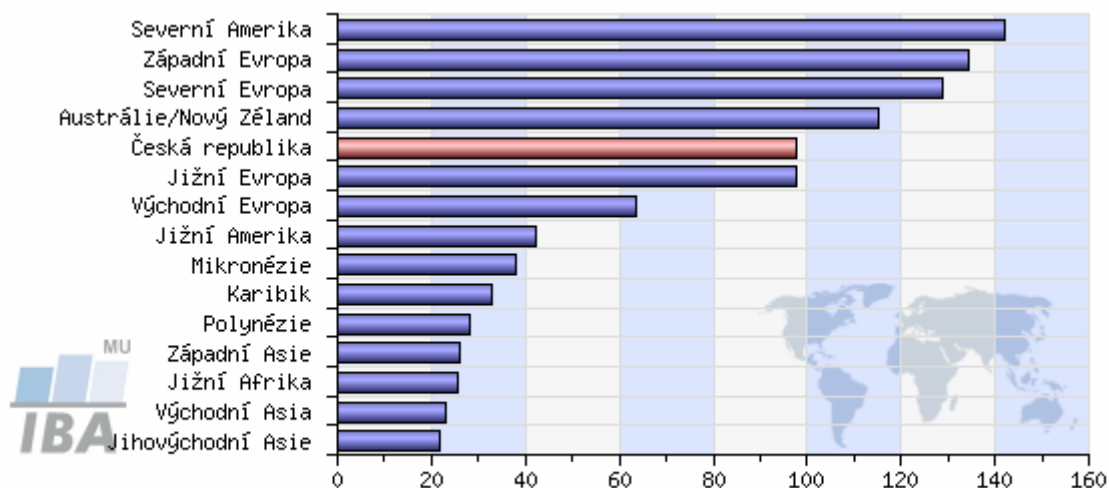
2.1.2 Karcinom prsu

Dalším v pořadí je karcinom prsu (10,1%) a když si uvědomíme, že se týká v podstatě jen jedné poloviny lidstva, je jeho výskyt ještě dramatičtější. Bohužel se tento nádor objevuje v relativně nízkém věku. Vzestup výskytu začíná už kolem 35. roku života, nicméně maximální strmosti křivka dosahuje po 40. resp. po 45. roku věku (obr. č. 8) [10].



Obr. č. 8: Graf výskytu karcinomu prsu v závislosti na věkové struktuře populace (převzato z [7])

Jde o karcinom, který vede nejvíce k úmrtí na malignity u žen. Mortalita u žen je poměrně vysoká, v různých regionech je jiná, nejvyšší je v severní Americe, v západní a severní Evropě – až 140/100 000 (obr. č. 9). Incidence choroby se stále zvyšuje (o 25% za posledních 30 let). Pokud se onemocnění podaří detekovat záhy, má velmi dobrou prognózu (až 95% osob, které mají pouze malý nádor bez zvětšení lymfatických uzlin přežívá více než deset let) [11].



Obr. č. 9: Graf srovnání incidence karcinomu prsu u žen ve všech subkontinentech světa v přepočtu na 100000 obyvatel (převzato z [7])

U nás se provádí screeningové vyšetření od 45 let věku ženy. Od tohoto věku má každá žena nárok na mamografické vyšetření prsou každé dva roky až do svých 69 let, kdy riziko již opět klesá. Ve vlastním zájmu by si každá žena měla toto hrazené vyšetření doplnit ještě o ultrazvukové vyšetření prsou. Navíc již od mládí by si ženy měly provádět samovyšetření prsou. O této technice by je měl poučit jejich ženský lékař. Pokud se v rodině vyskytl karcinom prsu opakovaně, žena by měla být pod kontrolou již mnohem dříve, protože některé karcinomy prsu se objevují dědičně, a většinou se v takovém případě objeví již v nižším věku [10].

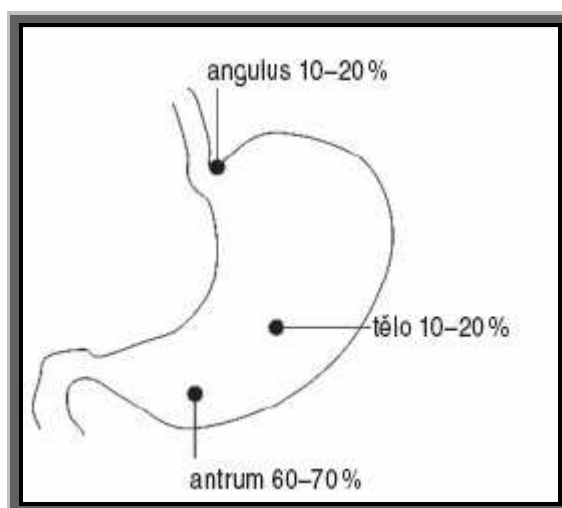
Neznáme mnoho rizikových faktorů ovlivňujících výskyt karcinomu prsu. Nicméně je známo, že čím delší dobu žena kojí, tím nižší je riziko vzniku karcinomu prsu. Ženy, které mají první dítě až po třicítce, se vystavují poněkud vyššímu riziku vzniku tohoto karcinomu [1,10].

Počínající chorobu můžeme odhalit pomocí nádorových markerů Ca 15-3, CEA a TPS. Pomocí těchto onkomarkerů lze rovněž monitorovat následnou terapii [11].

2.1.3 Karcinom žaludku

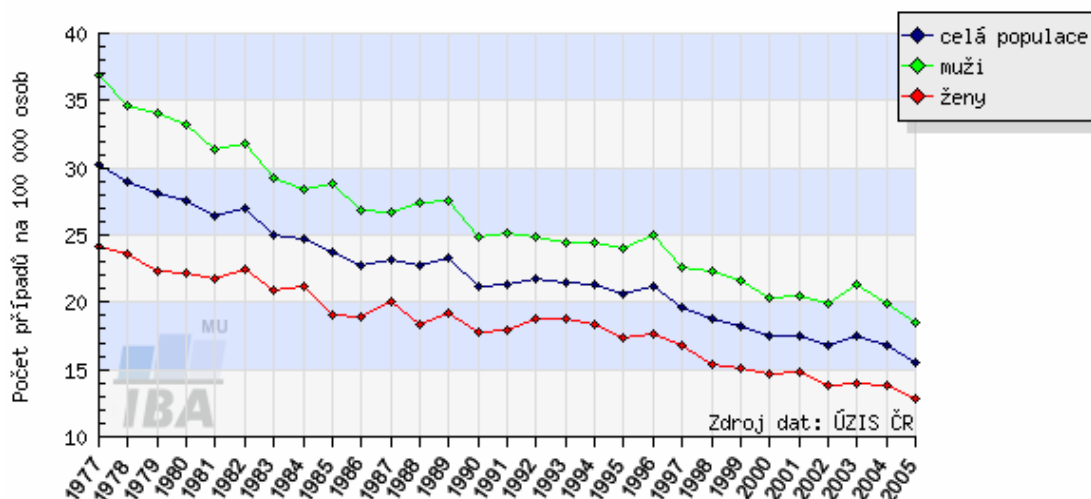
Nádorem, který celosvětově zaujímá místo třetí, je karcinom žaludku s 9,8%, nicméně ve většině rozvinutých zemí jeho výskyt postupně klesá již od počátku 20. století [12]. Stále však zůstává problémem některých zemí světa jako je například Japonsko nebo státy bývalého Sovětského svazu [10].

Jeho výskyt pravděpodobně souvisí se složením stravy, hlavně s její nedostatečnou tepelnou úpravou, resp. s konzumací syrové stravy a s tím spojeným výskytem chronických infekčních onemocnění trávicího traktu, především vlastního žaludku (obr. č. 10) [10]. Nesporný vliv na vznik karcinomu žaludku mají kancerogeny přijímané ve stravě. Vysoká incidence těchto nádorů v Japonsku je přičítána vysokému obsahu nitrosaminů a nitrosamidů v potravě z ryb, konzervované nakládáním do soli a uzením. Zvýšená expozice kancerogenů se týká také některých profesí, horníků, pracovníků v niklových hutích, dělníků v gumárenských závodech a pracujících s asbestem. Nadměrné požívání koncentrovaných forem alkoholu a stejně i kouření se pokládají za další významné faktory žaludeční kancerogeneze. Polypy žaludeční sliznice nejsou pokládány za přímé prekancerózy pokud nemají vilózní struktury. Za rizikové stavy z hlediska vývoje karcinomu nutno pokládat také stavy po předchozích resekcích žaludku, zvláště v oblasti anastomóz [13].



Obr. č. 10: Typická lokalizace karcinomu žaludku (převzato z [12]).

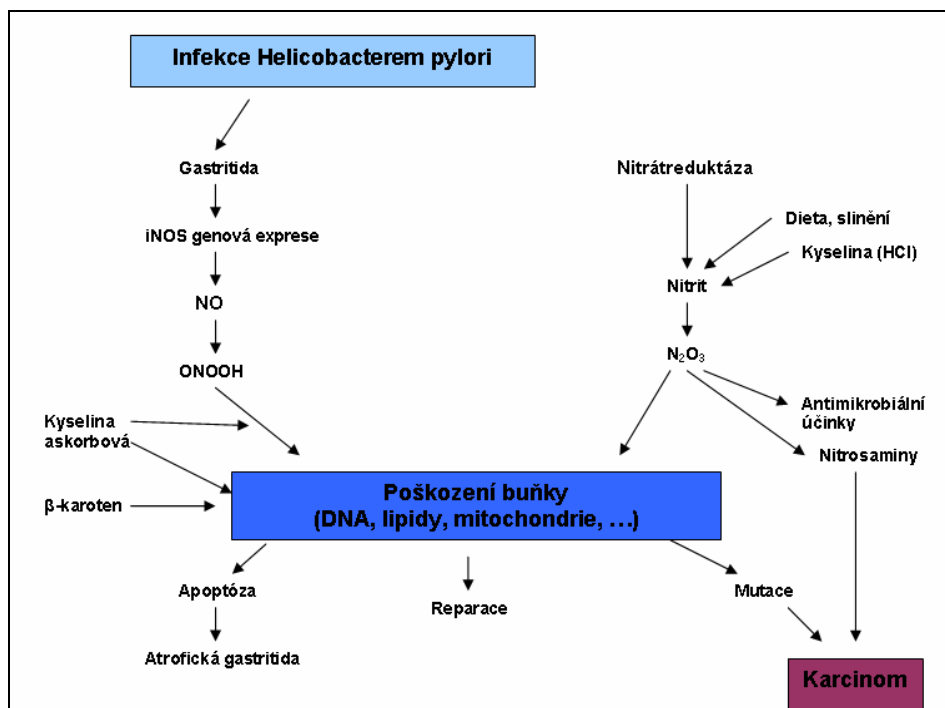
U nás se jeho výskyt pohybuje na relativně nízké úrovni (obr. č. 11), nicméně vzhledem k tomu, že stejně jako u karcinomu plic nemáme žádné signály nebo možnosti screeningových vyšetření, které by upozornily na časně stadium nádoru, je jeho perspektiva dosti nepříznivá, protože když se objeví obtíže, často nádor již prorůstá do svého okolí a ani operační zákrok nebývá úspěšný na dlouho [10].



Obr. č. 11: Graf výskytu karcinomu žaludku u mužů a žen v závislosti na čase (převzato z [7])

Z nádorových sérových markerů je možno očekávat pozitivitu CEA, CA19-9 a CA72-4. V posledních letech se dostalo sledování markeru CA72-4 na první místo, při specifické 95% je senzitivita 40 – 45%, což je výrazně lepší než u ostatních markerů nádorů GIT (CA19-9 32%, CEA 24%). I když přímou diagnostickou cenu toto vyšetření v podstatě nemá, mohou být výchozí předléčebné hodnoty dobrou orientací pro další monitorování efektu léčby a průběhu onemocnění [13].

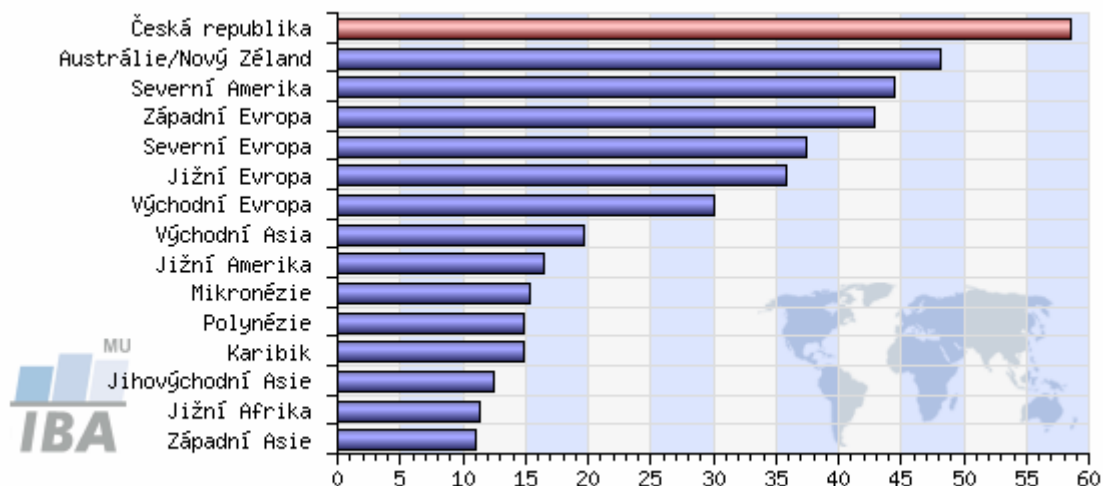
Specifická prevence karcinomu žaludku neexistuje. Za onkologicky prospěšnou je pokládána eradikace *Helicobacter pylori* (obr. č. 12), včasná léčba chronické gastritidy a vředové choroby žaludku. Časté požívání koncentrovaného alkoholu, kouření, nadměrně solených či uzených výrobků jsou další rizikové faktory, které mají být zdůrazňovány v onkologické prevenci. Nesporným civilizačním přínosem pro prevenci karcinomu žaludku je zvýšené užívání konzervace zmrazením a celoroční dostupnost čerstvé stravy [13].



Obr. č. 12: Role *Helicobacter pylori* při vzniku karcinomu žaludku (převzato z [14]).

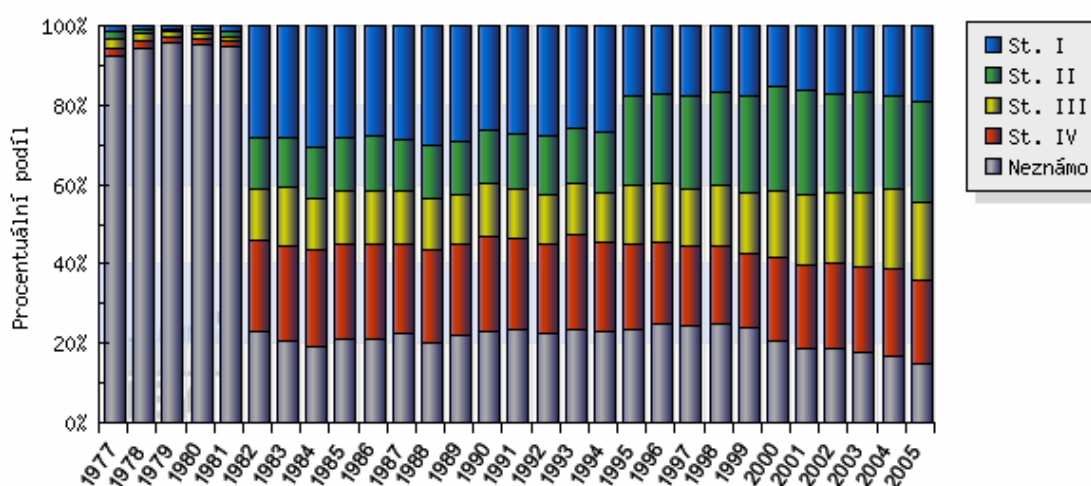
2.1.4 Kolorektální karcinom

Na čtvrtém místě se z hlediska častosti umístil kolorektální karcinom s 9,5%. V podstatě jsou to dva nádory, v některých přehledech se uvádějí odděleně jako karcinom konečníku a karcinom tlustého střeva. U mužů je u nás výskyt obou těchto nádorů prakticky shodný, u žen mírně převažuje karcinom tlustého střeva. U mužů i u žen jsou u nás tyto nádory na druhém místě co do častosti výskytu (u mužů dominuje karcinom plic, u žen karcinom prsu) [10]. V celosvětovém měřítku je Česká republika na prvním místě v incidenci i mortalitě tohoto onemocnění (obr. č. 13).



Obr. č. 13: Srovnání incidence nádoru tlustého střeva a konečníku (muži) všech subkontinentů světa, přepočten na světový standard (ASR-W) (převzato z [7])

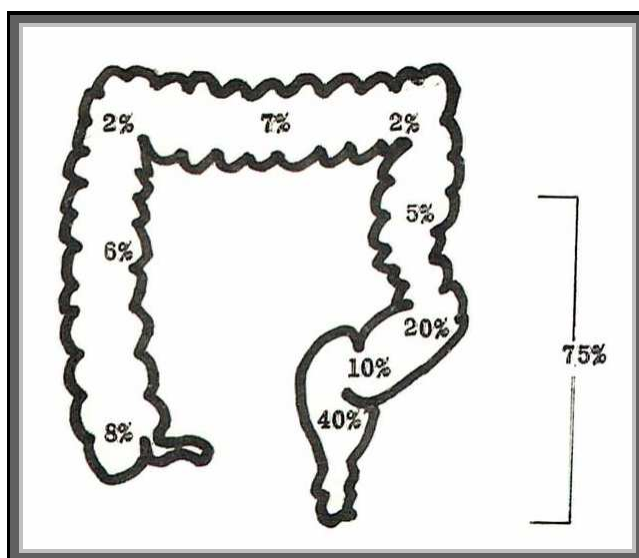
Kolorektální karcinom je další z nádorů, který je na vzestupu především v rozvinutých státech Evropy a v USA. Naopak v asijských státech je jeho výskyt dosud relativně nízký [1]. Celosvětová mortalita na toto onemocnění se pohybuje mezi 8,6 /100 000, v některých částech Evropy však stoupá až na 30 a více/100 000. Přežití závisí na stavu onemocnění, ve kterém je choroba detekována (I. fáze 85 – 100%, II. fáze 70%, III. fáze 30 -60%) (obr. č. 14) [11].



Obr. č. 14: Vývoj zastoupení klinických stadií karcinomu tlustého střeva a konečníku (převzato z [7]).

Tyto nádory dolní části trávicího ústrojí mají při včasném záchytu relativně dobré vyhlídky na vyléčení. Proto se také u nás přistoupilo k zavedení screeningové metody, která by měla odhalit již počáteční stadia nádoru. Principem je odhalit tzv. okultní krvácení, stopy krve ve stolici, což může být právě první známkou přítomnosti nádoru. Na toto vyšetření má jednou za dva roky nárok každý občan naší republiky starší 50 let. Odběr si provede každý sám doma, odběrovou soupravu poskytuje praktický lékař i s náležitým poučením. Bohužel zdrojů krvácení je ve střevech hodně, takže toto vyšetření dává často falešně pozitivní výsledky. Je tedy třeba vyšetření opakovat, popřípadě následně ověřit endoskopickým vyšetřením [10].

I u tohoto nádoru známe jen některé rizikové faktory, či spíše faktory, které snižují riziko vzniku nádoru dolní části trávicí trubice (obr. č. 15). Na základě epidemiologických studií byla za rozhodující rizikový faktor u tohoto nádoru označena výživa. Jedná se především o nízký obsah vlákniny a nadměrný podíl tuků ve stravě populace rozvinutých zemí Evropy a Ameriky. V současné době je předmětem zájmu možný podíl pití piva (především vzhledem k obsahu nitrosaminů) v porovnání s pitím vína [1]. Jedním z nejvýznamnějších ochranných faktorů je normální váha a dostatek tělesného pohybu. Naopak riziko vzniku těchto nádorů výrazně stoupá u lidí obézních a u lidí, kteří mají nedostatek tělesného pohybu [10].

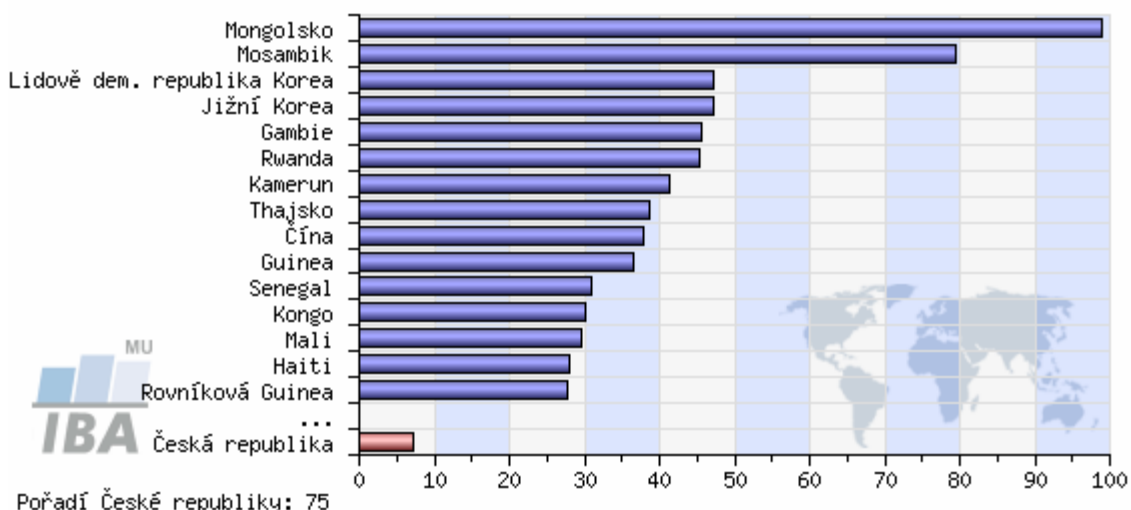


Obr. č. 15: Distribuce karcinomů v různých částech tlustého střeva a rekta (převzato z [15]).

Nejvýznamnějším nádorovým markerem u kolorektálního karcinomu je stanovení hladiny CEA. Monitorování CEA je velmi přínosné také při odhalování metastáz. U karcinomů, které CEA neprodukují, je vhodné vyšetřovat CA19-9. Dalším doporučovaným markerem, zejména u málo diferencovaných invazivních nádorů je TPA, který současně bývá nepříznivým prognostickým parametrem [1].

2.1.5 Karcinom jater

Hepatocelulární karcinomy se nejčastěji vyskytují v Asii a Africe (v rozvojových zemích). V České republice patří opět ke vzácnějším nádorům, s maximálním výskytem ve věku 40 – 60 let, 3x více u mužů [1,10] (obr. č. 16).



Obr. č. 16: Srovnání incidence karcinomu jater a intrahepatálních žlučových cest (muži) v ČR s ostatními zeměmi světa, přepočten na světový standard (ASR-W) (převzato z [7])

Toto onemocnění má vysokou mortalitu (až 13/100 000 u mužů a 6/100 000 u žen). Karcinom jater bývá často sdružen s jiným jaterním onemocněním (poškození virové, alkoholem, chemické atd.). Je-li však jaterní funkce alespoň částečně zachována, má tato choroba dobrou prognózu (při operačním řešení je pětileté přežití kolem 30%) [11].

U nás se nevyskytují nejvýznamnější rizikové faktory pro vznik tohoto nádoru, chronická infekční žloutenka B a C, jaterní parazité a konzumace

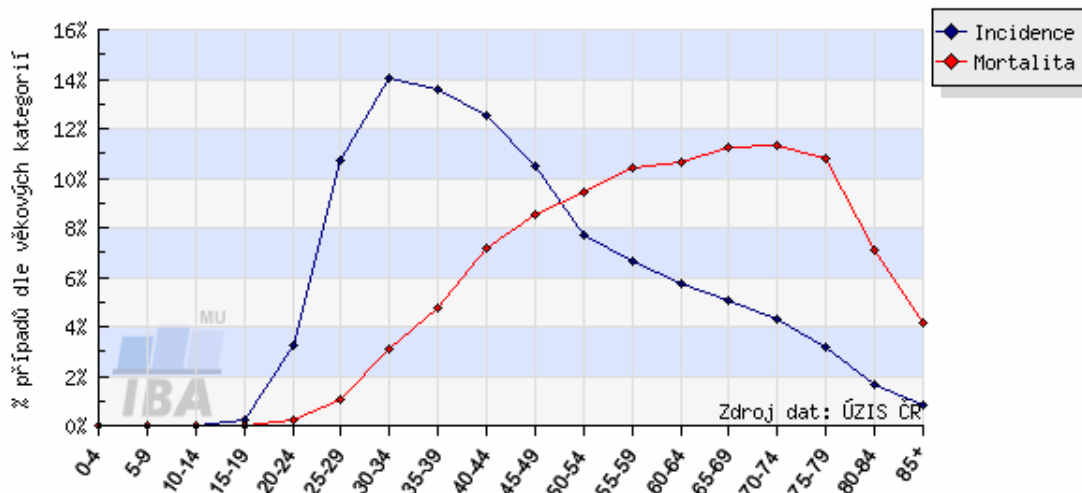
potravin kontaminovaných plísněmi, konkrétně produktem jedné z plísní – aflatoxinem [10].

Na přítomnost počínajícího nádoru může poukazovat zvýšená hladina AFP a ferritinu. K monitorování efektu chemoterapie lze AFP použít asi u 80% nemocných. V ostatních případech lze vyšetřovat ferritin.

2.1.6 Karcinom čípku děložního

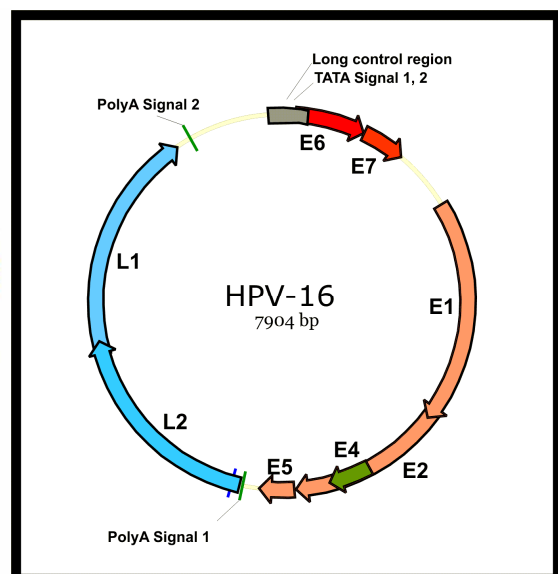
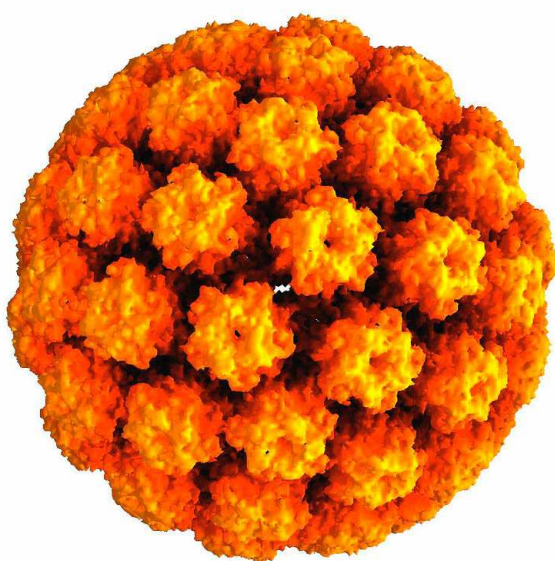
Naopak poslední z této skupiny nádorů se u nás vyskytuje, i když by tomu tak nemuselo být. Karcinom děložního čípku je spojován s chronickými infekcemi ženského pohlavního ústrojí, které souvisí zejména s častým střídáním partnerů, zvláště pokud se objeví u žen, které ještě nerodily. V tomto případě se nejedná o známé pohlavní choroby, ale o choroby, jejichž projevy nejsou většinou nijak nápadné, a proto nepřivedou "nositelku" k lékaři. Často jsou způsobovány viry, což znesnadňuje jejich stanovení i léčbu. Vzhledem k tomuto nejvýznamnějšímu rizikovému faktoru se onemocnění může objevit již po 20. roce věku. Nicméně toto onemocnění má rovněž velmi dobrou prognózu, neboť lze odhalit již stadium před vznikem nádoru, tzv. prekancerózu. Následný zákrok je velmi šetrný a nijak radikální, takže ženu nijak neomezuje v jejím dalším životě [10].

Incidencí okolo 20 žen na 100 000 obyvatel (19,8 v r. 2000) je rakovina děložního čípku druhým nejčastějším gynekologickým nádorovým onemocněním. Incidence je zhruba o 50% vyšší než v evropských zemích (nejnižší např. Finsko 5,7, Izrael 6,4). Mortalita je okolo 7/100 000 žen, což představuje úmrtí přibližně 360 žen ročně. Průměrný věk postižených žen je 49 let s maximem prvního vrcholu okolo 35 až 45 let a druhého vrcholu kolem 65 – 75 let (obr. č. 17). Vyšší incidence je u sociálně a ekonomicky slabší skupiny žen [15].



Obr. č. 17: Věková struktura populace pacientek s nádorem hrdla děložního za období 1977 – 2005 (převzato z [7]).

Za rizikový faktor je považována infekce papillomavirem (HPV - human papillomavirus, zejména typy 16, 18, 45 a 56) (obr. č. 18), které působí jako promotor nebo kokarcinogen a spolu s dalšími faktory (kouření, nedostatek A vitamínu, imunodeficience) indukuje maligní transformaci buněk epitelu čípku. Pětileté přežití je u této diagnózy udáváno kolem 65% nemocných, pro klinické stadium I = 90% [16].

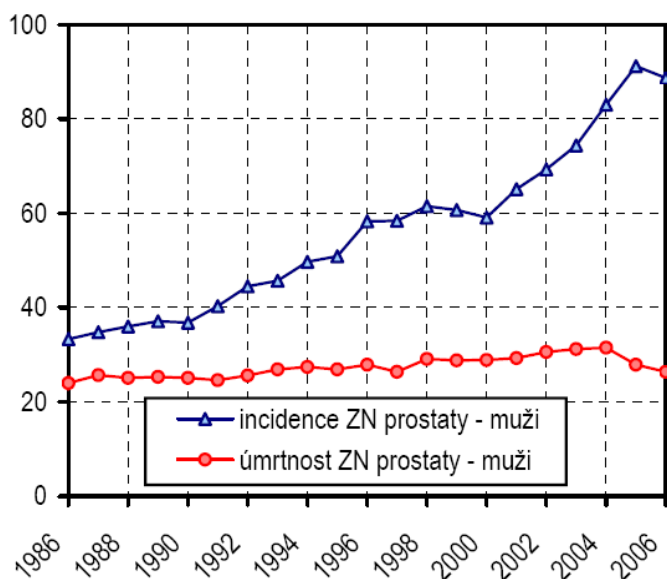


Obr. č. 18: Lidský papillomavirus a jeho genom – červené geny E6 a E7 dokáží nastartovat nádorové bujení v hostiteli (převzato z [17]).

Pro 95% nádorů čípku děložního je typická produkce SCC, která koreluje se stádiem onemocnění. Marker se však neužívá ani pro screening ani pro primární diagnostiku, ale pro monitorování průběhu choroby a efektu terapie. V současnosti se jako vhodný marker pro tento typ karcinomu doporučuje také vyšetření CYFRA 21-1 [1].

2.1.7 Karcinom prostaty

Tento typ nádoru patří k nejčastěji se vyskytujícím nádorům u mužů s výrazně vzestupnou incidencí (obr. č. 19). Výskyt vzrůstá s věkem, postihuje asi 25% mužů 70 – 80ti letých a 70% mužů nad 80 let. Někdy je překvapivým nálezem u operovaných pro benigní hypertrofii. Nádor (nejčastěji adenokarcinom různého stupně zralosti) vychází převážně z části prostaty uložené periferně, dobře přístupné palpaci. Šíří se postupně na celý lalok, ev. prostatu a dále přes pouzdro na semenné vajíčky a trigonum. Velmi zřídka prorůstá do konečníku. Metastázování může probíhat cestou lymfatickou i krevní, nejdříve do retroperitoneálních uzlin, především malé pánve, pak do kostí, plic a jater [18].



Obr. č. 19: Vývoj incidence a úmrtnosti na zhoubné nádory prostaty u mužů v ČR (převzato z [6])

V počátečních stádiích nemají nemocní žádné obtíže. Mikční obtíže, stejně jako u benigní hypertrofie nebo zánětu, jsou pozdními projevy onemocnění [18].

Od počátku 80. let je k dispozici relativně velmi spolehlivý marker karcinomu prostaty v podobě prostatického specifického antigenu (PSA). PSA samotné má však také své zřejmé limity pro detekci a sledování aktivity tohoto karcinomu. Pro diagnostiku má své opodstatnění nejen pravidelné stanovení sérové koncentrace PSA, ale stále i palpační rektální vyšetření [19].

Muže s benigní hyperplazií prostaty a hodnotou nádorového markeru PSA nad 10 µg/l je nutno považovat za rizikové vzhledem k možnosti vzniku karcinomu. Při opakovaně potvrzené hodnotě markeru je třeba podrobit je bioptickému vyšetření. Také muži starší 55ti let se stejnými hodnotami PSA v krvi mají být považováni za suspektní i bez klinických příznaků a je u nich indikováno vyšetřování vyšetřování palpační, sonografické i PSA opakované ve dvouměsíčních intervalech.

U karcinomu prostaty hodnoty PSA korelují také s rozsahem onemocnění. PSA bývá vyšetřován při monitorování průběhu onemocnění i při hodnocení efektu terapie chirurgické, radiační, hormonální i chemoterapie [1,20].

3. NÁDOROVÉ MARKERY

Nádorové markery jsou v současné době středem pozornosti při diagnostice, léčbě a dlouhodobém sledování nemocných s maligním onemocněním [21]. Jsou to molekuly převážně proteinového charakteru, které jsou přítomny v organismu v důsledku vzniku a vývoje maligního procesu [9]. Často vznikají v souvislosti se změněným metabolismem nádorově transformované buňky, a proto jejich hladiny v přítomnosti malignity výrazně stoupají (tab. č. 1). Lze je prokázat jednak histochemicky přímo v nádorové tkáni (celulární nádorové markery) a jednak v tělních tekutinách (humorální nádorové markery) [21]. Mohou být tedy produkovány přímo nádorovými buňkami (s nádorem asociované antigeny) nebo jinými tkáněmi jako jejich odpověď na maligní proces v organismu (indukované nádorové markery, např. proteiny akutní fáze) [9,22].

Vlastnosti tumorových markerů umožňují jejich využití v diagnostice a vyhledávání maligních onemocnění a zejména pak při stanovení prognózy a při monitorování pacientů v průběhu léčby [23]. Vzhledem k širokému spektru nádorových onemocnění však dosud neexistuje univerzální nádorový marker a ani senzitivita (správný záchyt nemocných) při dostatečné specifitě (správná negativita u lidí bez nádorového onemocnění) nedosahuje ideálních 100%. Proto tedy nezvýšená koncentrace nádorového markeru není ještě důkazem nepřítomnosti maligního onemocnění a naopak pozitivní výsledek nemusí nutně znamenat zhoubný nádor. Snahou je nalézt takové markery, které by byly orgánově specifické, detekovatelné v co nejčasnějším stadiu maligní transformace a které by korelovaly s růstem nádoru, stadiem, prognózou a účinností terapie. Diagnostický práh nádorových markerů umožňuje v příznivých případech odhalit nádor o velikosti asi 10^6 maligních buněk, zatímco klinická diagnóza bývá určena většinou až u nádoru, který obsahuje asi 10^9 buněk [9].

Tab. č. 1: Vlastnosti a použití tumorových markerů (převzato z [24]).

	<i>Biochemické vlastnosti</i>	<i>Mol. hmotnost (kDa)</i>	<i>Primární klinická aplikace</i>
<i>Alfa-fetoprotein (AFP)</i>	<i>Glykoprotein se 4% sacharidů, homologie s albuminem</i>	<i>~ 70</i>	<i>Hepatoocelulární karcinom a nádory zárodečných buněk (diagnóza a monitorování), prognóza nádorů ze zárodečných buněk</i>
<i>CA 125</i>	<i>Mucin identifikovaný monoklonálními protilátkami</i>	<i>~ 200</i>	<i>Ovariální ca (monitorování, prognóza po chemoterapii)</i>
<i>CA 15-3 (BR.27.29)</i>	<i>Mucin identifikovaný monoklonálními protilátkami</i>	<i>> 250</i>	<i>Karcinom prsu (monitorování)</i>
<i>CA 72-4</i>	<i>Glykoprotein identifikovaný monoklonálními protilátkami</i>	<i>~ 48</i>	<i>Karcinom žaludku (monitorování)</i>
<i>CA 19-9</i>	<i>Glykolipidid nesoucí Lewisa determinantu</i>	<i>~ 1 000</i>	<i>Karcinom slinivky (monitorování)</i>
<i>Karcinoembryonální antigen (CEA)</i>	<i>Glykoproteinová rodina, 45-60% sacharidů</i>	<i>~ 180</i>	<i>GIT a další karcinomy (monitorování)</i>
<i>CYFRA 21-1</i>	<i>Fragmenty cytokeratinu 19</i>	<i>~ 30</i>	<i>Ca plic a močového měchýře (monitorování)</i>
<i>Estrogenový receptor</i>	<i>Nukleární transkripční faktor</i>	<i>65</i>	<i>Ca prsu (predikce odpovědi na endokrinní terapii)</i>
<i>Lidský choriový gonadotropin (hCG)</i>	<i>Glykoproteinový hormon, α a β-podjednotka</i>	<i>~ 36</i>	<i>Neseminomy, chorio-ca, hydatidiformní mola (diagnóza, monitorování), nádory zárodečných buněk (prognóza)</i>
<i>Neuron-specifická enoláza (NSE)</i>	<i>Dimer enzymu enolázy</i>	<i>~ 87</i>	<i>Malobuněčný ca plic, neuroblastom, apudom (monitorování)</i>
<i>Placentární alkalická fosfatáza (PLAP)</i>	<i>Termostabilní izoenzym alkalické fosfatázy</i>	<i>~ 86</i>	<i>Seminomy (monitorování) *</i>
<i>Progesteronový receptor</i>	<i>Nukleární transkripční faktor</i>	<i>A forma: ~ 94 B forma: ~ 120</i>	<i>Ca prsu (predikce odpovědi na endokrinní terapii)</i>
<i>Prostatický specifický antigen (PSA)</i>	<i>Glykoprotein, serinová proteináza</i>	<i>~ 36</i>	<i>Ca prostaty (diagnóza, screening, monitorování)</i>
<i>Antigen skvamózních buněk (SCC)</i>	<i>Glykoproteinová subfrakce antigenu T4</i>	<i>~ 48</i>	<i>Karcinomyskvamózních buněk (monitorování)</i>
<i>Tkáňový polypeptidový antigen (TPA)</i>	<i>Fragment cytokeratinu 8,18,19</i>	<i>~ 22</i>	<i>Ca plic a močového měchýře (monitorování)</i>
<i>Tkáňový polypeptidový specifický antigen (TPS)</i>	<i>Fragment cytokeratinu 18</i>	<i>~ 22</i>	<i>Metastatický ca prsu (monitorování)</i>

Novodobá historie nádorových markerů má počátky již v roce 1845 objevením Bence – Jonesovy bílkoviny. Dalším důležitým mezníkem bylo objevení molekuly lidského choriogonadotropinu (hCG) a její souvislosti s choriokarcinomem v roce 1928. Stanovení hCG se od té doby užívá jak pro diagnostiku, tak i pro kontrolu léčby tohoto nádoru. V pozdější době bylo zjištěno, že hladina hCG se mění i u dalších trofoblastických nádorů a lze ji využít pro jejich dlouhodobé sledování. Každé desetiletí a v posledních letech každý rok přibývá několik nových „slibných“ nádorových markerů tak, jako přibývají i naše znalosti o mechanismech nádorového bujení [21].

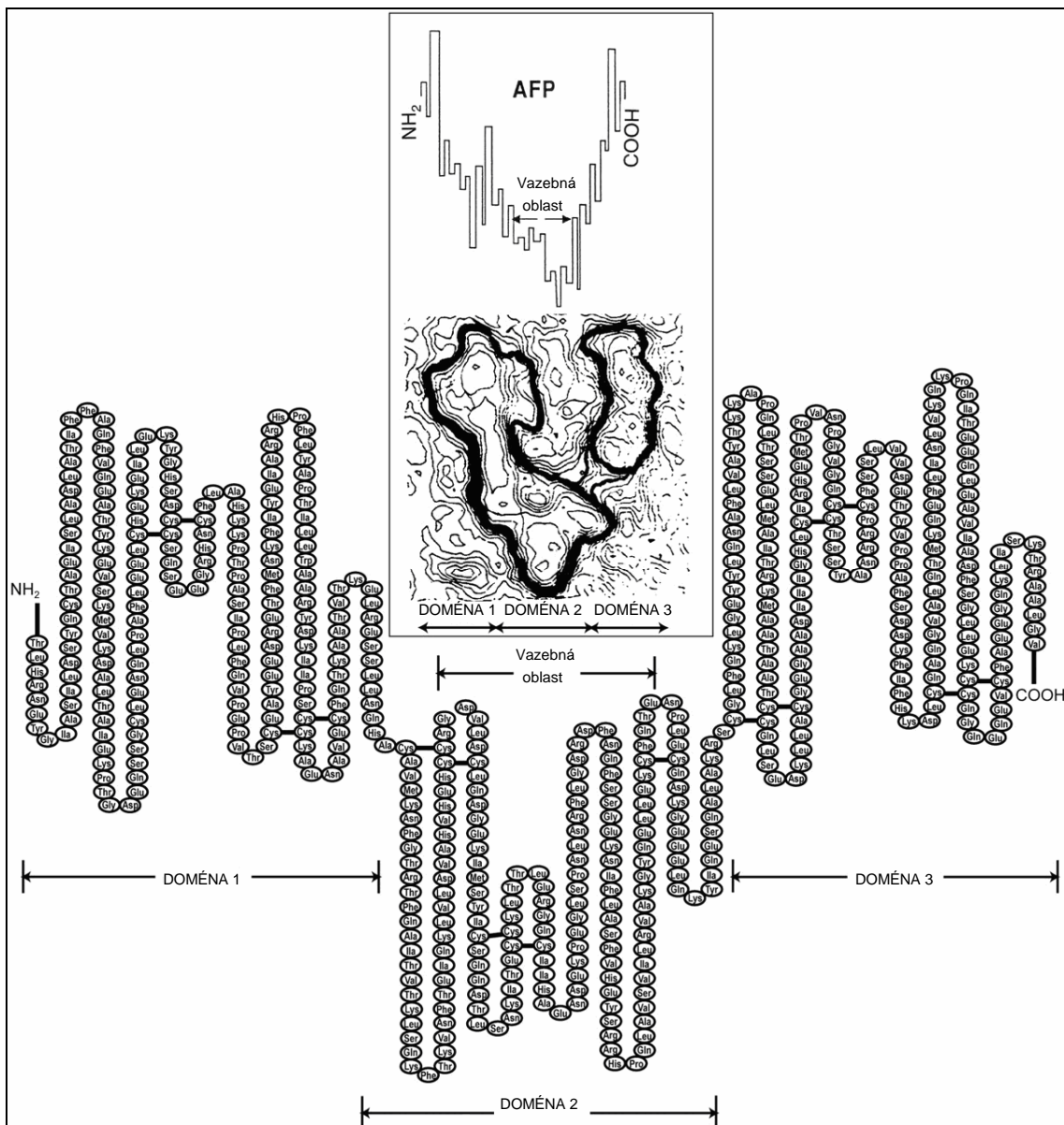
Nádorové markery můžeme rozdělit do tří skupin, mezi kterými však neexistuje vždy ostré rozhraní. Jsou to onkofetální antigeny, tkáňově či orgánově specifické antigeny a nespecifické antigeny a tumor markery [23].

3.1 Onkofetální antigeny

Jsou to látky, které mají důležité funkce během vývoje plodu. Produkce těchto látek se ve zdravých tkáních po narození snižuje až zastavuje, přesto však lze nízké koncentrace i u zdravých osob zachytit [9,23]. Při maligním procesu dochází prostřednictvím aktivace určitých genů k obnovení jejich produkce [23].

3.1.1 Alfa-fetoprotein (AFP)

AFP je glykoprotein o molekulové hmotnosti přibližně 67–72 kDa. Na jednoduchý polypeptidový řetězec (590 aminokyselin) propojený disulfidickými můstky jsou navázány sacharidy, jejichž obsah je 3–5% (obr. č. 20). Jeho struktura (3 hlavní domény) je podobná albuminu, v molekule AFP je však výrazněji zastoupeno několik aminokyselin (např. glycin, serin a izoleucin). Vzhledem k pohyblivosti na elektroforéze byl nazván svým objevitelem Abelevem (1963) alfa-fetoprotein. Na epitopové mapě AFP je dosud rozlišeno 16 epitopů, z nichž 3 jsou markerem konformačního stavu molekuly. AFP molekula z různých materiálů (sérum z různých nádorů, amniotická tekutina atd.) obsahuje různé varianty těchto epitopů [25].

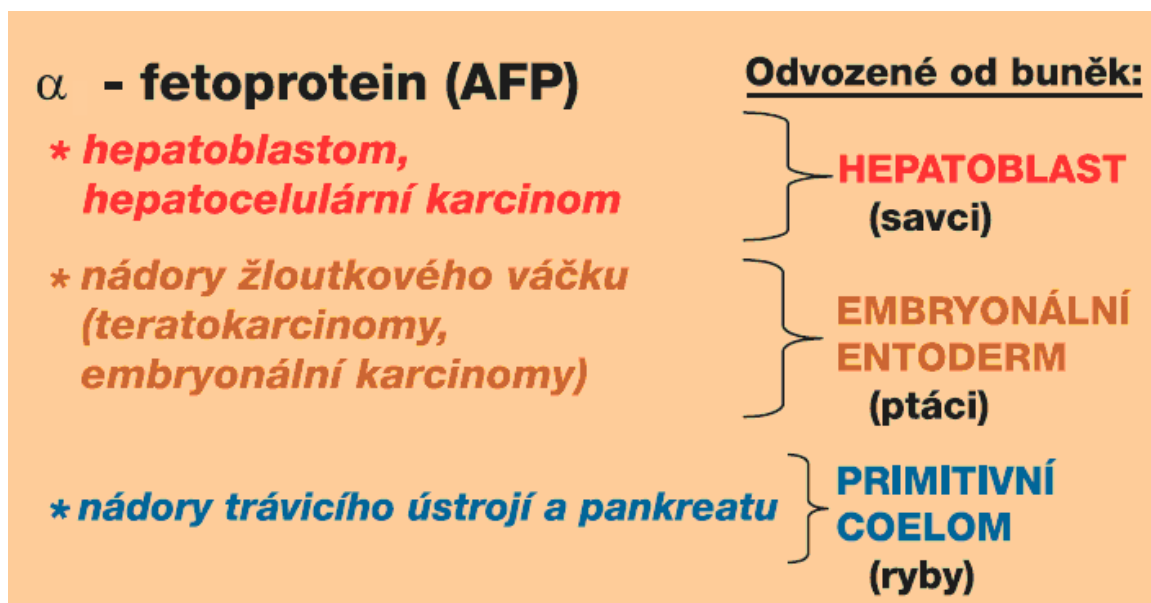


Obr. č. 20: Primární a sekundární struktura lidského AFP. Molekula je složena ze tří domén uspořádaných do tvaru písmene U. Lidský AFP patří do albuminoidní rodiny, která je charakterizována uspořádáním cysteinových zbytků, jež jsou složeny do vrstev vytvářejících smyčky předepisované disulfidickými vazbami. Třetí doména je umístěna těsně u navržené vazebné oblasti. Představa vazby se vyvinula ze zjištění, že lidský AFP má o dva disulfidické můstky méně než lidský albumin. Na vloženém obrázku je v horní části znázorněn dvourozměrný pohled na doménové uspořádání molekuly lidského AFP, ve spodní části elektronová bodová vrstevnicová mapa molekuly lidského AFP (převzato z [26]).

U embryí tvoří v krevní plasmě největší frakci, ve fetálním období je pak druhá za albuminem; po narození se velmi rychle snižuje a koncem 1. roku života je prokazatelná jen citlivými metodami (do 10 mg/l oproti 3 g/l u 14. týdenního fétu) [27]. Fyziologicky je produkován nejdříve žloutkovým váčkem, později fetálními játry. V koncentracích, ve kterých se nachází v první polovině těhotenství v plodu, má středně silné imunosupresivní účinky [23].

Zvýšená produkce nastupuje zejména u primárních nádorů jater (hepatoblastom, hepatocelulární karcinom), u některých embryonálních nádorů (teratoblastomy resp. nádory žloutkového váčku jako jsou některé germinální tumory, vzácně pak některé karcinomy pankreatu a gastrointestinálního traktu). Jde o nádory, které vznikly maligní transformací buněk produkujících v určité fázi fetoprotein fyziologicky, tj. buňky primitivního coelomu, buňky žloutkového váčku a hepatoblasty. Odráží se to i ve fylogenezi: játra jsou hlavním producentem AFP u savců; u ptáků je to žloutkový váček a u ryb střevo (tab. č. 2) [27].

Tab. č. 2: Hlavní místa tvorby alfa-fetoproteinu v průběhu ontogeneze a fylogeneze ve vztahu k AFP-pozitivním nádorům (převzato z [27]).



Fetoprotein z hepatoblastů a fetoprotein z buněk žloutkového váčku se liší ve složení postranního sacharidového řetězce. Projevuje se to různou afinitou k některým lektinům (konkanavalin A), což je možno použít i v diferenciální diagnostice. AFP se však může objevit ve zvýšené koncentraci i u nenádorových onemocnění. Značné zvýšení provází virovou hepatitidu kojenců (hodnoty přes 1000 µg/l nejsou vzácností). Vysvětluje se to tím, že hepatotropní viry nabudí zvýšenou syntézu fetoproteinu v ostrůvcích hepatoblastů, které přetrvávají v „dospělé“ jaterní tkáni ještě krátce po narození. Rovněž regenerující se jaterní tkáň se vyznačuje vyšší produkcí fetoproteinu. Zvýšená hladina u těhotných žen má svůj původ ve fetálních játrech. Vyšetření AFP jako rizikového faktoru pro sekundární prevenci hepatocelulárního karcinomu má význam u pacientů s chronickou hepatitidou B nebo C a dále v některých populacích Afriky a Asie [27].

V séru dospělých zdravých osob se koncentrace sérového AFP obvykle pohybuje pod koncentrací 10 µg/l. Koncentrace u novorozenců postupně klesá, až ve druhém roce dosahuje hodnot dospělých osob. Cirkulující "volný AFP" je hlavní imunoreaktivní formou AFP. Je známa i forma vázaná, která však není immunochemicky detekovatelná z důvodu zamaskování antigenních determinant vysokomolekulárními proteiny cytoskeletárního typu a dalších proteinů [28].

U maligních onemocnění se provádí screening AFP v séru pouze u symptomatických nemocných, a to s jaterní cirhózou, u nemocných s podezřením na germinativní nádory varlat (nesestouplé varle, nádor testes u sourozence - dvojčete) [29].

Monitorování průběhu onemocnění patří k základním využitím AFP. Pro hepatocelulární karcinom a hepatoblastom je AFP markerem první volby. Jeho senzitivita u neléčeného onemocnění patří k nejvyšším ve srovnání s dalšími markery u různých lokalizací tumoru - pohybuje se až kolem 80% při 90% specificitě. Senzitivita je poměrně vysoká i u germinativních nádorů ovariálních i testikulárních. Senzitivita pro čisté embryonální nádory dosahuje hodnot až 80%, u teratomu 20% [29].

Nespecifické zvýšení pozorujeme u akutní virové i chronické hepatitidy, u cirhózy i nekrózy jater. Při dlouhodobém sledování jaterních cirhóz, kde je pravděpodobnost vzniku karcinomu jater až 40x vyšší, lze nalézt hodnoty

až do 200 µg/l (zcela ojediněle až 500 µg/l). Nad 200 µg/l je již podezření na malignitu, důležitý je však trend hodnot [28].

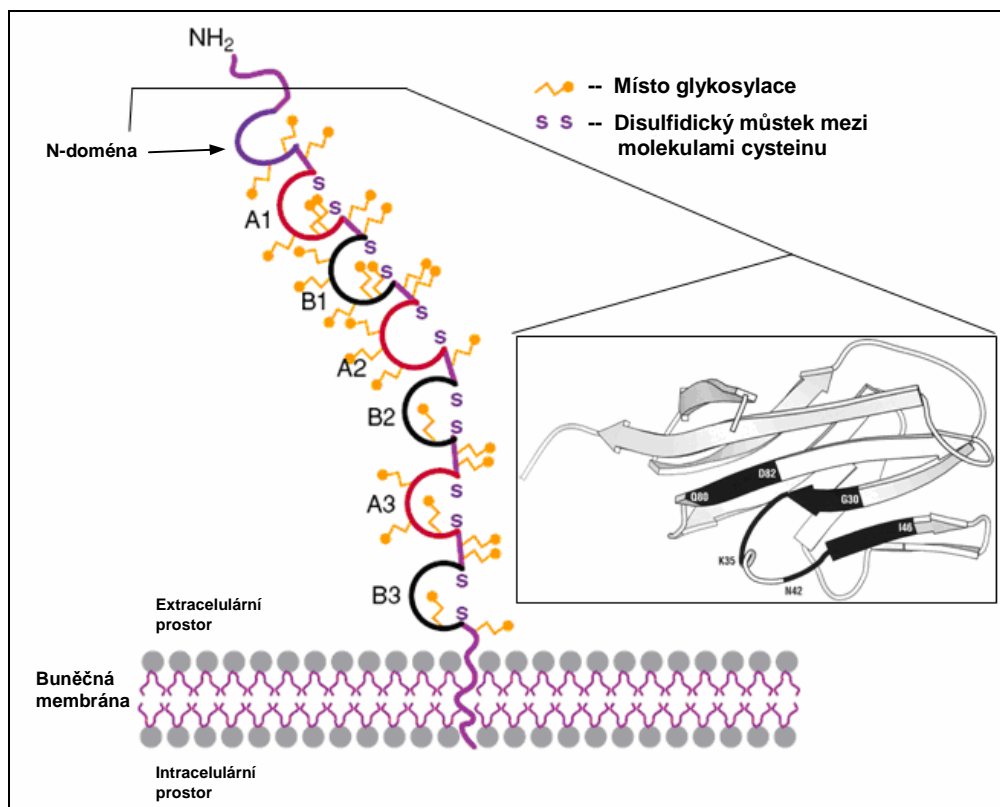
Zvýšení AFP je ve fyziologickém a patologickém těhotenství. Spolu s dalšími analyty (hCG, volný estriol a další) se využívá pro průkaz defektu neurální trubice, Downova syndromu a dalších vrozených vývojových poruch.

3.1.2 Karcinoembryonální antigen (CEA)

CEA, popsáný r. 1965, patří k nejdéle stanovovaným nádorovým markerům. Je to onkofetální protein s pravděpodobnou rolí v procesu buněčné adheze. CEA patří do imunoglobulinové supergenové rodiny, jejíž produkty jsou jak komplexní molekuly vyskytující se na buněčné membráně, tak i extracelulární molekuly s velice rozdílnými funkcemi. Kromě vlastního CEA, nescifického cross-reaktivního antigenu (NCA) a "CEA-Gene family Member-2" (CGM-2) lze do této skupiny proteinů kódovaných geny této rodiny zařadit také biliární glykoprotein (BGP), který je vázán transmembránově a jehož hladiny jsou v maligním procesu obvykle sníženy [30].

CEA je onkofetální glykoprotein s vysokým obsahem sacharidů (asi 55 %) [31]. Molekulová hmotnost je 180 – 200 kDa. Na polypeptidový řetězec, který je tvořen sedmi Ig doménami zakotvenými na povrchu buňky fosfatidylinositolovou vazbou, jsou navázány sacharidové řetězce vazbou N-acetylglukosaminu na asparagin (obr. č. 21)[32].

Mechanismus působení CEA je dosud nejasný. Předpokládá se, že funkcí CEA je především působit jako repulzní molekula zabraňující kontaktu mezi buňkami. Exprese těchto molekul na povrchu nádorových buněk, která může vést k narušení nádorové struktury, pak může usnadňovat jejich migraci a motilitu, tj. tvorbu metastáz [33].



Obr. č. 21: **Struktura CEA.** Protein CEA se skládá z vedoucí sekvence a tří vysoce zachovaných opakujících se domén (1 - 3), z nichž každá obsahuje 178 aminokyselin. Každá ze tří opakujících se domén může být dále rozdělena na dvě sub-domény (A a B), které mají společnou charakteristickou sekvenci. Každá doména obsahuje čtyři cysteinové zbytky na obdobných pozicích, které se párují a tvoří tak A a B „smyčky“ stabilizované disulfidickými můstky mezi cysteiny. CEA je složen z 668 aminokyselin a jeho uspořádání je podobné uspořádání dalších členů imunoglobulinové supergenové rodiny. CEA vyčnívá z buněčné membrány do extracelulárního prostoru. K membráně je připevněn přes hydrofobní C-terminální část (M doména) (převzato z [34,35]).

Za fyziologických podmínek je CEA produkce pozorována ve vyvíjejícím se embryu, kde je syntetizovaný v epiteliálních buňkách, a to především na jejich membránách. Ve fetálním séru je prokazatelný od 8. týdne těhotenství. Jeho produkce je nejvyšší v období kolem 22. týdne gravidity. V dospělém věku je syntetizován v minimálním množství epiteliálními buňkami střevní sliznice, žaludku a bronchu [32].

Z benigních onemocnění je zvýšená koncentrace CEA v séru (a produkce příslušnou tkání) detekována především u nemocných s jaterní cirhózou, s hepatitidou, zánětlivým onemocněním pankreatu, s Crohnovou chorobou

a ulcerózní kolitidou. Rovněž některá benigní onemocnění mléčné žlázy mohou syntetizovat tento antigen (fibroadenomy, fibrocystická choroba) [30].

CEA se nachází především ve tkáni nádoru karcinomu tlustého střeva a konečníku [31]. Z dalších nádorů gastrointestinálního traktu (GIT) je CEA produkován nádory žaludku, pankreatu, jícnu a žlučových cest. I v těchto lokalizacích se nachází především u nádorů dobře a středně diferencovaných [33].

Hladiny tohoto markeru u karcinomu plic predurčuje histologický typ tohoto onemocnění, CEA se vyskytuje především u adenokarcinomu. Pro karcinom mléčné žlázy je CEA markerem druhé volby (po CA 15-3). Většina méně agresivních nádorů tento protein produkuje [32].

Z gynekologických nádorů je CEA charakteristický pro keratinizující epidermoidní nádory cervixu i pro určitou populaci endometriálních nádorů i nádoru děložního těla [30,33].

Karcinom močového měchýře, ledvin, diferencovaný karcinom prostaty a testikulární teratomy patří rovněž k nádorům pozitivním na CEA. Syntéza CEA v medulárních karcinomech štítné žlázy je dána přítomností neuroendokrinních C-buněk. Podobně i maligní nádory vycházející z neuroendokrinních struktur CNS vykazují jeho expresi (glioblastomy, meduloblastomy, malobuněčné karcinomy plic) [32].

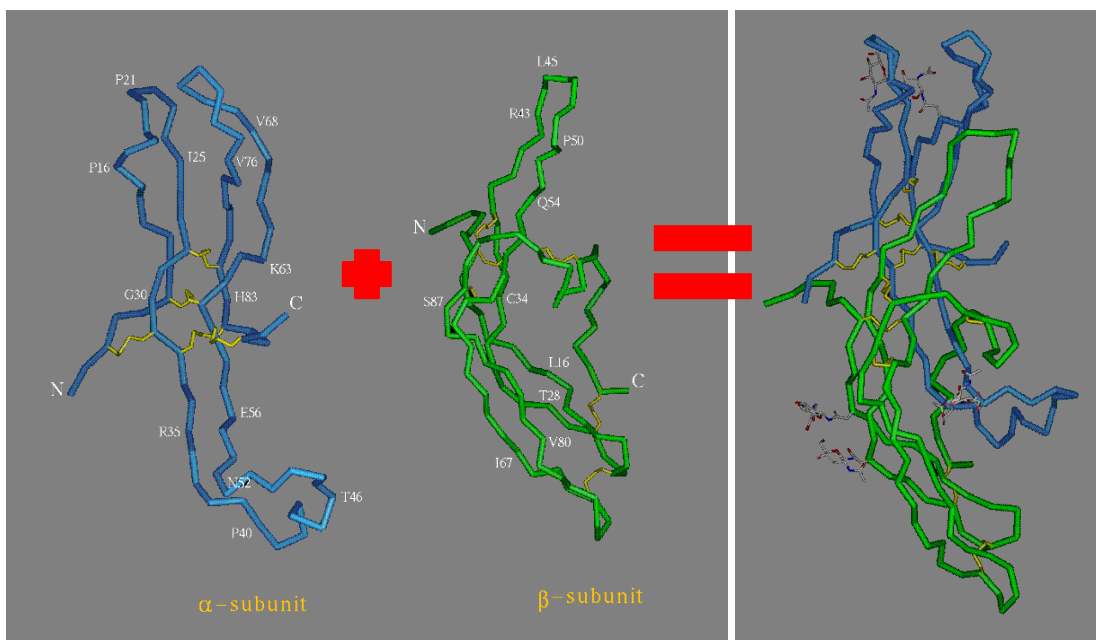
V séru dospělých zdravých osob se hladina CEA obvykle pohybuje pod koncentrací 5 µg/l (v závislosti na typu diagnostické soupravy). Výrazné zvýšení (až do 10 µg/l) je možno pozorovat u kuřáků (v závislosti na počtu vykouřených cigaret), ev. u alkoholiků. V extraktech primárních nádorů se obvykle nevyšetřuje. Význam však má stanovení v moči, pleurálním punktátu, ascitu i dalších tělních tekutinách u vybraných typů nádorů [36].

Monitorování průběhu onemocnění (detekce relapsu či rozsevu onemocnění a odpovědi na léčbu) patří k základním využitím CEA. Hodnoty vyšší než 10 µg/l znamenají obvykle progresi maligního procesu. Koncentrace vyšší než 50 µg/l svědčí s vysokou pravděpodobností o jaterních nebo kostních metastázách. Senzitivita a specifita CEA stanovení kolísá podle typu sledovaného nádoru a stadia onemocnění [37]. U benigních onemocnění obvykle hodnoty nepřesahují hranici 10 µg/l.

3.1.3 Lidský choriogonadotropin (hCG)

Lidský choriogonadotropin (hCG) patří do skupiny hormonů, které mají vztah k nádorovému onemocnění germinativního původu a gestačním trofoblastickým chorobám. Byl popsán v moči těhotných žen již před více než 70 lety, v těhotenství má význam spolu s AFP pro charakterizaci patologického těhotenství (Downův syndrom, trisomie 21). Je to glykoprotein o molekulové hmotnosti 36,7 kDa, vznikající v trofoblastických buňkách placenty. Je tvořen dvěma rozdílnými podjednotkami: alfa (14,5 kDa) a beta (22,2 kDa) (obr. č. 22). S dalšími glykoproteinovými hormony lutropinem (LH), folitropinem (FSH) a thyreotropinem (TSH), které jsou adenohipofyzárního původu, má podobnou strukturu alfa-podjednotky. Biologickou specifitu těchto hormonů podmiňuje především beta-podjednotka [38].

Je známa sekundární a terciární struktura hormonu: intercysteinové vazby vytvářejí na alfa- i beta-podjednotce můstky, které se podílejí na jejich interakci, event. vazbě k receptorům (obr. č. 22). Je známa vazba sacharidů prostřednictvím N- i O-glykosidické vazby [39].



Obr. č. 22: Struktura hCG (převzato z [40])

V prvních 6ti týdnech gravidity udržuje hCG žluté tělísko, podporuje produkci progesteronu a dále estrogenu. Význam produkce hCG v těhotenství je dosud nejasný, pravděpodobně se účastní i na vzniku imunotolerance plod - matka. Fyziologicky je hCG syntetizován placentou ihned po početí. Hladiny v mateřské krvi dosahují hodnot 10, 60 a 140 IU/l v 6., 8. a 12. týdnu těhotenství. Mezi 14. - 18. týdnem se jeho koncentrace ustalují na hodnotě 10 - 50 IU/l a přetrvávají až do porodu. Po porodu hodnoty klesají na koncentrace do 5 IU/l. Podíl volné beta-podjednotky v séru klesá v průběhu těhotenství ze 3 na asi 1 %. Zdrojem hCG u zdravých osob je pravděpodobně hypofýza. Citlivými technikami bylo prokázáno, že beta-hCG je přítomen na membránách většiny buněk maligních nádorů. Z toho lze předpokládat, že by mohl být universálním tumorovým markerem [38].

Nejvyšší hladiny hCG byly nalezeny u postmenopauzálních žen, koncentrace v séru zdravých mužů jsou asi třetinové. Referenční rozmezí závisí na použité metodě, obvykle se za diskriminační hranici považuje 5 IU/l. Koncentrace hCG v séru mohou být ovlivněny především v těhotenství (mnohočetná gravidita, hrozící potrat, mimoděložní těhotenství). Zdrojem zvýšených koncentrací hCG mohou být dále nádory germinativního a trofoblastického původu [39].

Metodiky vyšetření hCG mohou být ovlivněny rozdíly v imunochemickém systému, značení, senzitivitě a aviditě protilátek proti hCG, které mohou detekovat rozdílné epitopy na různých formách molekuly hCG a tím způsobovat nesouměřitelnost vyšetření provedených soupravami různých výrobců [41].

Screening hCG v séru lze použít pouze k monitorování symptomatických osob podobně jako AFP - tj. u osob s podezřením na germinativní nádory varlat. Koncentrace hCG mají význam pro zhodnocení stadia onemocnění, ev. postižení mízních uzlin před terapií. Mohou být použity také pro potvrzení histologické charakterizace nádorů testes (především neseminomů) a choriokarcinomů, ev. hydatidózní nebo invazivní moly [39].

Koncentrace hCG má velký význam pro sledování nemocných s nádory testes za účelem průkazu relapsu či ověření účinnosti terapie. Senzitivita hCG pro neseminomy se pohybuje kolem 50%, pro seminomy 10 - 20%. Téměř 100% senzitivitu lze nalézt pro choriokarcinomy. Senzitivita pro další lokalizace

nádorů (pankreas, GIT, plíce, mamma, ledviny, močový měchýř) se pohybuje obvykle kolem 10 - 20% [38].

3.2 Tkáňově či orgánově specifické antigeny

Jsou to látky, které se normálně nacházejí ve zdravé tkáni či orgánu a mimo něj pronikají jen v minimálním množství. Teprve při onemocnění, nejčastěji nádorovém (ale v menší míře i při zánětech či traumatizaci), dochází k jejich uvolnění [23].

3.2.1 Prostatický specifický antigen (PSA)

PSA byl poprvé identifikován Harou a kol. v roce 1969 [42]. Stanovení jeho hladin v séru se pro klinické účely začalo využívat počátkem 80. let 20. století [43].

PSA je serinová proteináza složená ze 240 aminokyselin v jednoduchém polypeptidovém řetězci. Molekulová hmotnost PSA je 34 kDa, obsahuje asi 10% sacharidů. PSA má chymotrypsinu podobnou aktivitu, katalyzuje hydrolýzu peptidových vazeb v místě tyrosinu a leucinu. V seminální plasmě se nachází v pěti formách. V séru je PSA vázán především na alfa1-anti-chymotrypsin (tvoří 95% celkového PSA), v menší míře na alfa2-makroglobulin. Určitý podíl PSA v séru se vyskytuje ve volné podobě - tj. volný PSA, nevázaný na bílkoviny [44,45].

PSA je produktem především prostatické tkáně, jak zdravé, tak i zhoubné. Je secernovaný do seminální tekutiny a umožňuje za fyziologických podmínek zkapalnění seminální plasmy štěpením seminogelinu a fibronektinu, čímž je usnadněn pohyb spermatozoí. PSA přítomný v séru nemá pravděpodobně významnou funkci, především z důvodu blokování velké části tohoto proteinu vazbou na alfa1-antichymotrypsin [46].

V séru dospělých zdravých mužů se hladina celkového PSA pohybuje v závislosti na věku od hodnot 2,5 µg/l (muži do 50 let) do 6,5 µg/l (nejstarší věková skupina). Detekovatelné množství PSA bylo nalezeno i v séru žen [47]. Koncentrace PSA v séru je však ovlivněna procesy, které mohou porušit různé stupně bariéry bránící volnému přechodu PSA z duktálních lumenů do séra. K základním mechanismům zvyšujícím jeho hladiny patří trauma, zánět, hypertrofie prostaty nebo maligní proces v této tkáni [37].

Sérový PSA vzrůstá nad diskriminační hranici po ejakulaci (o 0,8 µg/l v době 1 hod po ejakulaci), po digitálním rektálním vyšetření nebo po transrektálním ultrazvukovém vyšetření, podobně i po mechanickém dráždění prostaty (např. po jízdě na kole atd.). Výraznější a déle trvající zvýšení PSA (až po dobu 20ti dní) lze pozorovat po biopsii prostaty či po transuretrální resekci [44].

Přes velké nadnárodní studie prokazující význam stanovení PSA (spolu s digitálním rektálním vyšetřením) pro detekci maligního onemocnění prostaty u symptomatických mužů (jedenkrát ročně od 50 let) nejsou dosud definitivní doporučení uzavřena. Je však výhodné provádět screening u starších mužů se symptomy poruch močového traktu, event. u mužů s rodinnou zátěží tohoto onemocnění. Význam screeningu je limitován malou možností odlišit karcinom agresivní od benignější formy, která může mnohdy existovat v latentní podobě [47].

V současnosti se vyšetřuje také volná frakce PSA (free PSA), která představuje asi 15 – 30% celkového PSA. Poměr volné a vázané frakce PSA má význam především pro diferenciální diagnostiku benigních a maligních postižení prostaty, hlavně při hodnotách celkového PSA v rozmezí 4 – 10 µg/l, u nemocných s benigním onemocněním je tento poměr výrazně vyšší [9,43].

PSA je vhodný pro potvrzení stadia choroby. Zvýšené hodnoty se objevují u 95% metastatických nádorů, 82% stadií III nebo IV. Není pravděpodobné metastazování do kostí při hodnotě PSA nižší než 20 µg/l. Je prokázáno, že paradoxně PSA v nádoru mléčné žlázy může být výhodný prognostický ukazatel [47].

PSA se využívá rovněž u monitorování nemocných v remisi. Zvýšené hodnoty PSA po radikální prostatektomii značí buď zbytkovou chorobu (70%) či lokální návrat (30%). Monitorování má význam rovněž při léčbě radioterapií,

ev. hormonoterapií. Velikost poklesu PSA po úspěšné hormonoterapii je v korelaci s délkou přežití [43].

3.2.2 Neuron specifická enoláza (NSE)

NSE je glykolytický enzym katalyzující přeměnu 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát, přítomný ve tkáních neuroektodermálního původu, ve zdravém organismu především v neuronech. NSE, solubilní izoenzym enolázy, je obsažený v cytoplasmě buněk, vyskytuje se jako dimer tvořený podjednotkami alfa-gama nebo gama-gama. V podobě těchto homo- či heterodimerů se vyskytuje rovněž v tělesných tekutinách [48].

Za fyziologického stavu jej produkuje nervová a plicní tkáň plodu, v dospělosti je jeho výskyt v normálním stavu vázán především na neurony. Zvýšená exprese byla prokázána v neuroblastomech, meduloblastomech, malobuněčných karcinomech plic (SCLC), v apudomech, karcinomech ledvin a seminomech, proto je stanovení hladiny NSE využíváno k monitorování průběhu těchto malignit [49]. Vzhledem k obsahu NSE v erytrocytech a krevních destičkách je třeba provést oddělení krevních elementů nejpozději do jedné hodiny od odběru, jinak jsou naměřené hodnoty NSE falešně pozitivní - hemolýza vzorku tedy výrazně interferuje [37].

Referenční hodnoty NSE stanovené imunochemicky závisejí na typu soupravy, obvykle leží diskriminační hranice pro obě pohlaví na hladině 12 -15 µg/l.

Screening NSE se neužívá (snad jen pro určení neznámého primárního nádoru). Pro pacienty s neuroblastomy a SCLC má stanovení NSE prognostický význam [37,50].

Nejvyšší hodnoty bývají popisovány u dobře diferencovaných ganglioneuroblastomů a ganglioneuromů [37]. Zvýšená hladina NSE v séru může být pozorována také u nemaligních plicních onemocnění nebo jaterních chorob [50].

3.2.3 CA 125

CA 125 patří do skupiny nádorových markerů, které byly detekovány již začátkem 80. let na podkladě specifických protilátek [23]. Je to důležitý nádorový marker vhodný především pro monitorování karcinomu ovarií.

Přestože poznatky o molekule CA 125 jsou stále ještě neúplné, je zřejmé, že je to glykoprotein s vysokým obsahem sacharidů (24%) navázaných O-glykosidickou vazbou. Základní molekula má molekulovou hmotnost asi 200 kDa, je značně heterogenní jak co do velikosti, tak i do náboje [51]. Funkce CA 125 může být vázána s proteázovou aktivitou. Jeho detekce v reprodukčních orgánech naznačuje možnou roli při reprodukci. Jeho možná patofyziologická role snad souvisí s růstem a šířením nádoru [52].

CA 125 patří k diferenciacním antigenům, které jsou produkovány fetálními epiteliálními tkáněmi coelomového původu. V dospělém věku může být omezeně syntetizován v epitelu normální tkáně vejcovodů, bronchů, endometriu, cervixu, ale i v mezotelu pleury, perikardu a peritonea. Není prokazatelný v epitelu normálních ovarií [51].

Z nemaligních onemocnění je koncentrace CA 125 zvýšena obvykle u benigních ovariálních nádorů, endometriózy a chorob jater a pankreatu.

Expres CA 125 je pozorována především v epiteliálních buňkách karcinomů ovarií. Syntéza v dalších gynekologických nádorech nevykazuje již takovou senzitivitu, např. u karcinomů cervixu, endometria apod. [53].

Produkce CA 125 u dalších nádorů (karcinomy mléčné žlázy, pankreatu, plic, žlučových cest) zřejmě reflektuje především postižení pleury a peritonea z důvodu infiltrace nádorovými strukturami. Byla prokázána rovněž zvýšená hladina CA 125 u nemocných s hepatocelulárním karcinomem [52].

Sérový CA 125 je vyšetřován v rámci screeningu, stagingu (určení stadia onemocnění) a monitorování onemocnění karcinomu ovarií, u dalších gynekologických tumorů (těla děložního), u nádorů plic a prsu, speciálně v případě infiltrace pleury či peritonea nádorem, a u hepatocelulárního karcinomu. Rychlý pokles k normálním hladinám během chemoterapie je prediktorem delšího přežití nemocných s Ca ovarií [54].

Hodnoty sérové koncentrace CA 125 u normální zdravé populace se pohybují do 35 kU/l (99%) [53]. V procesu chronického onemocnění jater

nebo peritonitidy může hladina CA 125 dosáhnout hodnot i vyšších než 65 kU/l. Zvýšení sérového CA 125 je možno pozorovat i v dalších benigních procesech, dále i u gravidity, během menstruace nebo při endometrióze. V přítomnosti maligního procesu koreluje jeho hladina obvykle s nádorovou hmotou [54].

Vzhledem k nízké senzitivitě (obzvláště u stadia I) a nízké specificitě není vhodné provádět screening u nesymptomatické populace. V případě genetické zátěže (alespoň jeden příbuzný) syndromem ovariálního karcinomu je doporučeno stanovit CA 125 (spolu s vaginálním ultrazvukovým vyšetřením) každoročně. Ke stanovení diagnózy lze CA 125 použít pouze v situaci, kde není známa lokalizace primárního nádoru [37].

Hladina CA 125 je vhodným ukazatelem pro potvrzení stadia choroby. Vysoké hodnoty, které se po primární terapii nesníží, jsou indikací k „second look“ operaci. Senzitivita a specificita stanovení kolísá podle typu sledovaného nádoru a stadia onemocnění [37].

Vyšetření CA 125 bývá nejčastěji užito k monitorování průběhu onemocnění (detekce relapsu či rozsevu onemocnění a odpovědi na léčbu). Serózní typ karcinomu ovarií, kde je CA 125 markerem první volby, vykazuje senzitivitu až 90% (cut-off 65 kU/l). Je vhodné vyšetřovat CA 125 u dalších gynekologických tumorů (Ca těla děložního), u nádorů plic a prsu, speciálně v případě infiltrace pleury či peritonea nádorem, u hepatocelulárního karcinomu a u nádorů pankreatu [54].

Zvýšené hodnoty při benigní etiologii onemocnění mohou rovněž vykazovat tyto choroby: benigní onemocnění ovarií a endometria, leiomyom, selhání ledvin. Zvýšení CA 125 je možno pozorovat u těhotenství, při menstruaci a endometrióze [53,54].

3.2.4 CA 15-3

CA 15-3 je marker diferenciačního typu definovaný na podkladě monoklonálních protilátek. Je to glykoprotein, který je produkován především karcinomy mammy, ev. dalšími adenokarcinomy. Jeho stanovení komerčními soupravami je možné od r. 1985. Patří k základním markerům pro sledování vývoje onemocnění pacientek s karcinomem prsu [37].

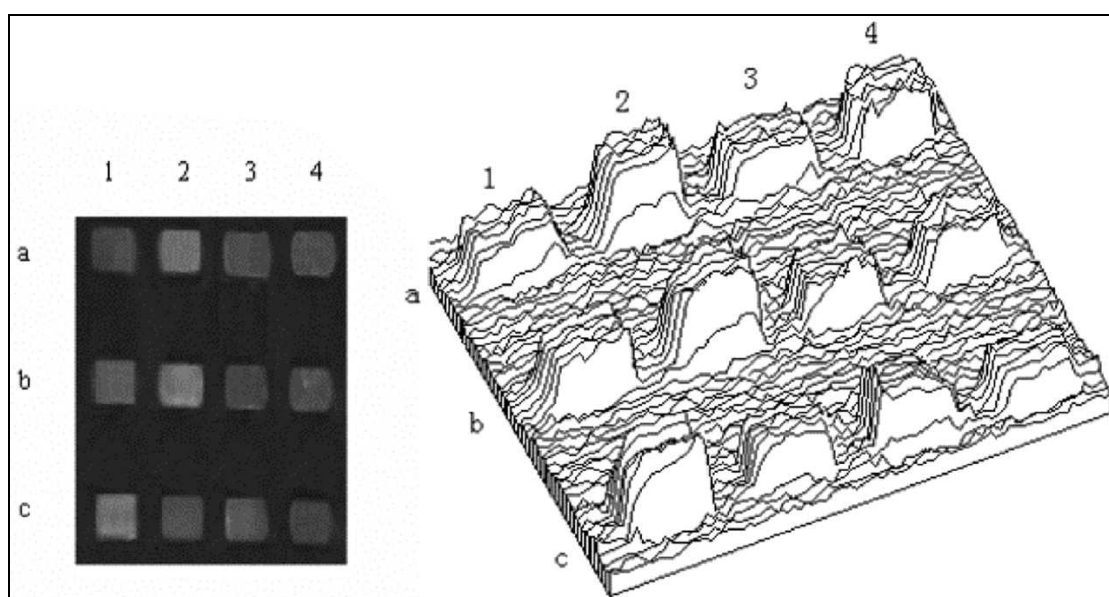
Fyziologická role CA 15-3 pravděpodobně souvisí s ochranou epiteliálních struktur (lubrikace). V patologických podmínkách (ve tkáni karcinomu prsu) se pravděpodobně účastní vazby na adhezivní molekuly [55].

CA 15-3 vyšetření v séru patří k základní technice pro monitorování nemocných s karcinomem prsu. Jeho metodická "robustnost" umožňuje sledovat a matematicky hodnotit dynamiku změn jeho koncentrací pro odhad vývoje onemocnění. Zvýšení koncentrace tohoto markeru v procesu metastazování často předchází průkazu rozsevu diagnostikovaného zobrazovacími metodami. Jeho hladina obvykle koreluje s hmotou nádoru. Je zvýšen i v séru některých benigních onemocnění [55].

Koncentrace CA 15-3 je zvýšena především z důvodu exprese tohoto antigenu u benigních onemocnění prsu, z důvodu poškození jater a ledvin, u zánětu plic, u revmatického onemocnění, rovněž fyziologicky v těhotenství. Hlavním zdrojem zvýšení CA 15-3 je však maligní proces v mléčné žláze [37].

Diskriminační hranice CA 15-3 zdravých žen je obvykle 30 kU/l, u nemocných s nádorem mammae s parciální remisí je možno pozorovat i přetrvávající vyšší hodnoty.

Metody stanovení CA 15-3 lze rozdělit do dvou kategorií podle užitých monoklonálních protilátek (obr. č. 23) [55].



Obr. č. 23: Optický proteinový čip pro detekci CA 15-3 v séru. Anti-Ca 15-3 protilátky imobilizované po reakci se sérem pacienta obsahujícím CA 15-3 antigen (převzato z [56]).

Určitý přínos má hladina CA 15-3 při stanovení diagnózy pouze u nádorů s neznámým primárním nádorem. Diference mezi časem průkazného nárůstu markerů a časem průkazu progresu („lead time“) umožňuje předpovědět návrat onemocnění s předstihem několika měsíců [57].

Zvýšené hladiny CA 15-3 v séru je možno pozorovat rovněž u benigního onemocnění prsu, benigního onemocnění trávicího ústrojí, jaterní cirhózy, akutní a chronické hepatitidy, chronické renální insuficience, chronické bronchitidy a pneumonie [57].

3.2.5 CA 19-9

CA 19-9 patří k tumor-asociovaným antigenům definovaným na podkladě monoklonálních protilátek. Specifická protilátka odpovídá modifikované determinantě krevních skupin typu Lewis. Jeho výskyt je charakteristický pro adenokarcinomy pankreatu, žaludku, tlustého střeva, jater a vybraných gynekologických nádorů. Stanovuje se často v kombinaci s CEA [37].

Molekula CA 19-9 odpovídá haptenu determinanty lidské Lewis^(a+) krevní skupiny. Vyskytuje se jako glykolipid ve tkáni nebo mucin v séru, molekulová hmotnost asi 36 kDa (lipid), event. výrazně vyšší (mucin) [58].

Úloha CA 19-9 je dosud neznámá. Patří k onkofetálním antigenům, vyvíjející se plod jej syntetizuje v epiteliálních strukturách pankreatu, žlučových cest, v žaludku. Produkci CA 19-9 ve stopových množstvích je možno pozorovat i v dospělosti, především ve žlázových strukturách pankreatu, žlučníku, bronchů a některých gynekologických nádorů. Kolem 5% populace tento antigen vůbec netvoří [58,59].

Benigní onemocnění jsou zdrojem koncentrací zvýšených většinou do hodnoty až 100 kU/l. Při maligních onemocněních dosahuje koncentrace CA 19-9 v séru mnohonásobku hodnoty diskriminační hranice (až 10⁶ kU/l) [60,61]. Referenční intervaly jsou definovány podle výrobce metody, obvykle leží diskriminační hranice CA 19-9 do 37 kU/l.

Stanovení CA 19-9 je založeno na reakci antigenu s monoklonální protilátkou. Je možno vyšetřovat sérum, ascites a tekutinu benigních ovariálních

cyst. Při stanovení mohou interferovat HAMA protilátky. Falešnou pozitivitu může působit rovněž kontaminace vzorku slinami, ev. potem [37].

I přes vysokou senzitivitu především pro nádory pankreatu není možno užít tento marker pro časnou primární diagnostiku tohoto onemocnění. Koncentrace CA 19-9 obvykle výrazně nekoreluje s nádorovou hmotou, avšak dobře koreluje s hodnocením efektu terapie. Výrazně zvýšené hladiny s často exponenciálním nárůstem (nad 10 000 kU/l) jsou však průkazem vzdálených metastáz [61].

I mírná cholestáza může způsobit výrazné zvýšení CA 19-9 koncentrace v séru. Z dalších onemocnění jsou zvýšené hladiny nalézány u benigních a zánětlivých onemocněních žaludku, střeva, pankreatu a jater. V benigních pankreatických cystách se pohybují hladiny CA 19-9 obvykle do 100 kU/l, výjimečně až do 2000 kU/l [61].

3.2.6 CA 72-4

Stanovení CA 72-4 je založeno na detekci antigenu TAG 72 (mucinového komplexu o molekulové hmotnosti větší než 10^3 kDa) glykoproteinového typu determinovaného monoklonálními protilátkami (1981). U plodu je jeho produkce typická pro epitelální buňky žaludku a pankreatu. V dospělosti je prokazatelný především u maligních nádorů žaludku, střeva, pankreatu, mléčné žlázy a některých nádorů ovaria [62]. Stopové množství CA 72-4 bylo prokázáno rovněž v dospělých tkáních plic, v gastrointestinálních a reprodukčních orgánech zdravých jedinců [62,63]. Koncentraci CA 72-4 v séru mohou ovlivnit i některá benigní onemocnění patřící do skupiny postižení jater, ledvin a zánětlivých onemocnění GIT [61].

Referenční hodnoty jsou závislé na typu soupravy, obvykle leží diskriminační hranice CA 72-4 na hladině 4,6 až 6,7 kU/l. Metoda stanovení je založena na sendvičové reakci dvou specifických monoklonálních protilátek. Kromě séra je vyšetřován rovněž ascites, ev. tekutina pankreatických cyst [37].

Screening se nepoužívá. V kombinaci s CEA může odlišit benigní a maligní proces pankreatu vyšetřením tekutiny cyst. Odhad závažnosti onemocnění koreluje s přítomností vzdálených metastáz. Hladina CA 72-4 v séru se používá k monitorování průběhu onemocnění především u karcinomu žaludku. Vhodně

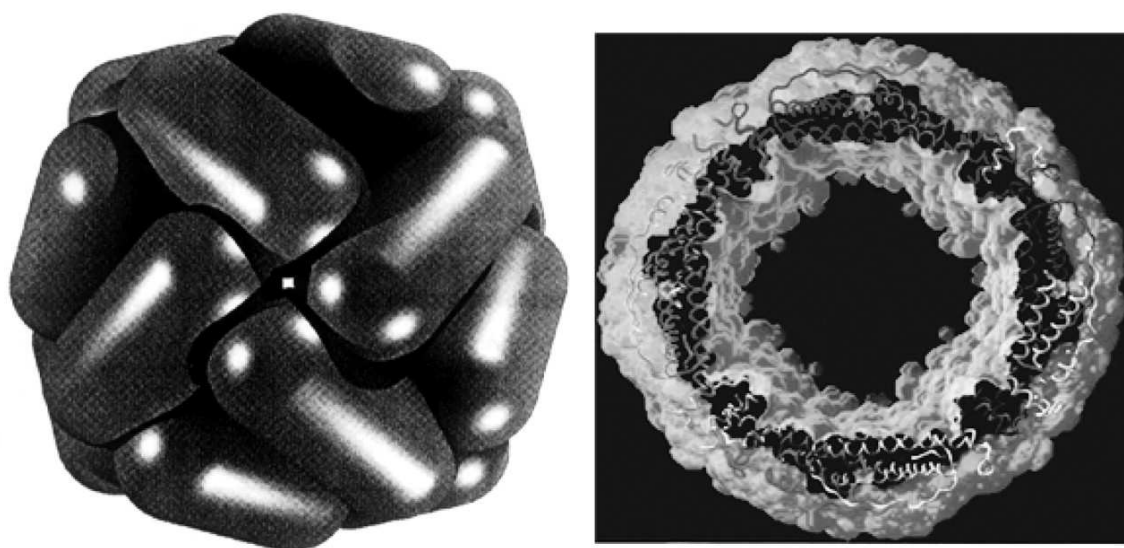
doplňuje sledování u nemocných s nádory kolorekta, neprodukcí CEA nebo CA 19-9. Vykazuje rovněž dostatečnou senzitivitu pro monitorování nemocných s metastázami uvedených nádorů do jater [61].

3.3 Nespecifické antigeny a tumorové markery

Tyto látky mohou vykazovat ektopickou produkci, tj. syntézu ve tkáni, v níž za fyziologického stavu nejsou produkovány [9].

3.3.1 Ferritin

Ferritin je vysokomolekulární bílkovina o molekulové hmotnosti kolem 450 kDa, specializovaná na uskladnění železa ve tkáních. Základem molekuly ferritinu je apoprotein – apoferritin - složený z 24 podjednotek uspořádaných do tvaru duté koule s prostorem uvnitř pro železité ionty (obr. č. 24) [23]. Uvnitř tohoto útvaru se shromažďuje relativně velké množství železa ve formě hydroxyfosfátu železitého. Každá molekula ferritinu může obsahovat až 4500 atomů železa, které udržuje v rozpustné, pro organismus netoxické a biologicky využitelné formě [64].



Obr. č. 24: Struktura ferritinu (převzato z [65]).

Podjednotky se vyskytují ve dvou velikostech: těžké (heavy, H-typ), které jsou kyselé a vyskytují se hlavně v srdci, a lehké (light, L-typ), jež jsou slabě bazické a vyskytují se v játrech. Ferritin je tedy tvořen směsí dvou imunologických podtypů H a L. Tyto strukturálně odlišné molekuly nazýváme izoferritiny, jejich poměr závisí na tkáni, ze které pochází, a liší se svými imunologickými vlastnostmi a izoelektrickými body [23,64].

Ferritin se potenciálně vyskytuje ve všech buňkách těla a v tělesných tekutinách, ale nejvíce je soustředěn v játrech, slezině, kostní dřeni a v kosterním a srdečním svalstvu. V těhotenství se vyskytuje též v placentě. Hladiny ferritinu v séru jsou poměrně nízké. Velmi dobře korelují s celkovým množstvím zásob železa v organismu [64]. U zdravých jedinců se sérové koncentrace liší u mužů a u žen v produktivním věku. U žen v menopauze se pak tyto koncentrace blíží hodnotám nacházeným u mužů. U dětí jsou hladiny ferritinu obecně nižší než u dospělých [23].

Ferritin může vázat *in vitro* hemové skupiny protoporfyrinu IX za vzniku hemo ferritinu. Vazba hemu ovlivňuje vychytávání železa ferritinem [66].

Ferritin cirkulující v krvi je směsí sérového ferritinu (glykosylovaný ferritin, považuje se za normální sekreční produkt buněk, delší poločas) a tkáňového ferritinu, který se uvolňuje z poškozených buněk. V krvi může ferritin vytvářet komplexy s jinými proteiny, např. alfa2-makroglobulinem [64]. Při stanovení koncentrace ferritinu neinterferuje bilirubin, hemoglobin, cholesterol, triglyceridy, heparin (testované koncentrace uvádí výrobce).

K vyšetření hladiny ferritinu v séru se přistupuje při detekci deficitu Fe, posouzení odpovědi na perorální léčbu železem, diferenciální diagnostice anemií, monitorování zásob Fe u chronického renálního selhání (včetně dialyzovaných pacientů), detekci stavů akumulace Fe a odpovědi na léčbu, posouzení procesů v CNS (odlišení arteficiálního od skutečného krvácení, odhad intenzity agresivních procesů v CNS - zánětů a nádorů) [67,68].

Mezi příčiny zvýšení hladiny ferritinu v séru řadíme alkoholismus, reakce akutní fáze (záněty, nádory, AIM, hyperthyreóza, M. Gaucher), poškození jater, hemochromatózu, hemosiderózu, některé anemie při chronických stavech a maligní onemocnění (a. systémová neoplazie (akutní myeloblastické leukemie, M. Hodgkin, mnohočetný myelom, nehodgkinovské lymfomy);

b. nespecifická produkce (primární hepatom, germinální tumory testis, karcinom plic, karcinom prsu)) [69].

Mezi příčiny snížení hladiny ferritinu v séru řadíme opakované dárcovství a odběry krve z diagnostických důvodů, bezmasou stravou, zejména u žen, mikrocytární anemii z nedostatku železa, krvácení do GIT, menstruační ztráty, některé malabsorpce (obvykle kombinovaná porucha rezorpce Fe, B12 a folátu) [64,69].

3.3.2 Beta₂-mikroglobulin (β₂-M)

β₂-M je glykoprotein o poměrně nízké molekulové hmotnosti, a proto prochází glomerulárním filtrem. Je sekvenčně homologický s konstantními částmi H – řetězců lidských imunoglobulinů, což naznačuje jejich společný původ. Váže se na membrány buněk s HLA antigeny. Syntéza β₂-M není vázána na B – lymfocyty, produkují jej i jiné typy tkáňových buněk. Nachází se ve všech tělních tekutinách a ve všech buňkách kromě erytrocytů a trofoblastických buněk. Tvoří součást antigenního systému HLA. Fyziologické rozmezí je 0 – 2,5 mg/l [9].

Eliminace z organismu se děje prostřednictvím ledvin, velký podíl je reabsorbován v proximálních tubulech. Porucha v glomerulární filtraci vede ke zvýšení jeho koncentrace v séru. Poškození tubulů je naopak provázeno zvýšenou koncentrací v moči. Zvýšení jeho sérových hladin je pozorováno i u chronických zánětlivých onemocnění, masivních buněčných nekróz (při chemoterapii a aktinoterapii nádorů), u chronických onemocnění jater a ledvin, u ledvinného selhání, především při léčbě hemodialýzou.

Ve skupině maligních chorob má β₂-M význam především pro sledování průběhu mnohočetného myelomu, chronické lymfatické leukémie a lymfomů. Při interpretaci výsledků je třeba vždy mít na paměti funkční stav ledvin [20,21].

3.3.3 Laktátdehydrogenáza (LD)

LD je buněčný enzym, vyskytující se v cytoplazmě všech buněk těla. Katalyzuje reverzibilní oxidaci pyruvátu na L-laktát v posledním kroku anaerobní glykolýzy. Jako koenzym využívá NAD^+ (nikotinamidadenin dinukleotid). Vyskytuje se jako homo- nebo heterotetramer, tvořený jedním nebo dvěma různými typy podjednotek - existují 3 typy polypeptidových řetězců, kódovaných různými geny. Nejrozšířenější jsou formy H (heart) a M (muscle). Třetí, tzv. X forma se vyskytuje pouze ve spermích. Kombinací podjednotek M a H, tvořících tetramer, vzniká 5 izoenzymů: LD_1 (H_4), LD_2 (H_3M), LD_3 (H_2M_2), LD_4 (HM_3) a LD_5 (M_4). Tyto izoenzymy lze odlišit elektroforeticky, k anodě se nejrychleji pohybuje LD_1 , nejrychlejší katodickou pohyblivost má LD_5 . Jednotlivé tkáně se liší jejich poměrným zastoupením. Izoenzym LD_1 (H_4) převažuje v myokardu, erytrocytech a ledvině. Je často nalézán u testikulárních germinálních tumorů (seminomy 80%, neseminomy 60%) a představuje u nich nezávislý prognostický faktor, který je spolu s ostatními biochemickými markery součástí stagingu [23]. Nejvíce LD_5 (M_4) je v játrech a některých typech vláken kosterního svalu. Izoenzymy LD_3 a LD_4 se vyskytují v monocytech. Stanovení aktivity se využívá hlavně k posouzení onemocnění myokardu, jater a hemolytických anemií. U ne Hodgkinských lymfomů je stanovení LD součástí mezinárodního prognostického indexu (IPI). Zvýšenou aktivitu nalézáme také ve výpotku karcinomatózního původu. [22,70].

Vyskytuje se také v likvoru, kde se jeho stanovení používá pro diagnostiku některých neurologických onemocnění, zejména k rozpoznání meningitid a jejich etiologie [70].

Vzhledem k výskytu tohoto enzymu ve všech buňkách těla není stanovení aktivity celkové LD proto příliš specifické pro určité onemocnění. Význam stanovení LD se v současnosti snižuje právě vzhledem k nespecifitě, hlavními diagnostickými oblastmi zůstávají stavy spojené s rozpadem buněk například v rámci nádorových onemocnění nebo hemolytických anemií. Zvýšené hodnoty LD nalézáme také u poškození jater a svalové tkáně. Dříve se využívalo stanovení celkové aktivity a poměru izoenzymů elektroforeticky při diagnostice akutního infarktu myokardu zachyceného v pozdější fázi, tento význam LD však vymizel [23].

Vyšší aktivity nacházíme v dětství. V těhotenství se aktivita LD nemění. Hodnoty aktivity LD jeví také rasovou variabilitu, u černé populace jsou vyšší. Fyziologické hodnoty aktivity LD v séru se u populace starší 15ti let pohybují do 4,12 $\mu\text{kat/l}$. Vzhledem ke značným rozdílům výsledků v jednotlivých laboratořích bývá zvykem udávat zvýšení proti normě v násobcích horního limitu referenčního rozmezí pro danou metodu stanovení. Hodnoty do 1,5násobku jsou považovány za prognosticky dobré, 1,5 – 10ti násobek za středně špatné, nad 10ti násobek za velmi špatné [23].

4. METODY STANOVENÍ NÁDOROVÝCH MARKERŮ

Většina vyšetřovaných solubilních nádorových markerů se stanovuje v séru. Jde obvykle o štěpy velkých molekulárních komplexů, a proto nevykazují příliš velkou preanalytickou variabilitu. Pro správnou interpretaci změn v hladinách markerů, zejména při dlouhodobém sledování nemocných s nádorovými chorobami, je třeba vyloučit možné rušivé faktory, které by mohly stanovení ovlivnit už ve fázi preanalytické. V určitých případech mohou být výsledky analýzy ovlivněny některými postupy klinického vyšetřování; např. pro stanovení prostatického specifického antigenu (PSA) má být odebrána krev nejdříve 48 hod po rektálním vyšetření prostaty, ovlivnit jeho hladinu může i jakákoliv manipulace s prostatou včetně jízdy na kole nebo sexuální aktivity. Kontaminace vzorku slinami nebo potem může znehodnotit stanovení antigenu skvamózních buněk (SCCA) nebo CA 19-9. Neuron-specifická enoláza (NSE) je při hemolýze významně uvolňována z erytrocytů, oddělení séra od krevních elementů je třeba provést nejpozději do 1 hod po odběru.

V současné době se nádorové markery stanovují většinou pomocí metod imunochemické analýzy. Principem těchto reakcí je vazba mezi antigenem (nádorovým markerem) a k němu specifickou protilátkou. Detekci vytvořeného imunochemického komplexu umožňuje značení radionuklidem (radioimunoanalýza, RIA, nebo imunoradiometrické stanovení, IRMA), enzymem (enzymoimunoanalýza, EIA, ELISA), fluorescenčním nebo chemiluminiscenčním indikátorem (FIA, CLIA). Pro kvantifikaci nádorových markerů mohou být použity i další metody – metoda vazby látky na sérové proteiny apod. [9,22]. Ve stále větší míře se používají automatizované imunoanalytické systémy, které využívají nejčastěji fluorescenční či chemiluminiscenční značení. Jsou sice podstatně dražší, ale práce s nimi je pro personál méně náročná [23].

Koncentrace markerů v séru se pohybuje ve velice nízkých hodnotách (podle typu parametru řádově v $\mu\text{g/l}$, event. v ng/l). Kalibrační materiál může být v různých komerčních soupravách rozdílný podle stupně purifikace (neexistují obvykle mezinárodní standardy). Koncentrace nádorových markerů je pak vyjadřována v konvenčních jednotkách (U/l, kU/l atd.). Výběr optimální metody

stanovení je ovlivněn především parametry spolehlivosti vlastního metodického postupu (přesnost, správnost, detekční limit, použitelné koncentrační rozmezí, specifita protilátek). Je však třeba brát v úvahu také další faktory: možnost automatizace, nutné přístrojové vybavení, stabilitu reagensů, možnost co nejjednodušší kalibrace, čas nutný k vyšetření, a v neposlední řadě i cenu vyšetření.

Při zavádění analýzy určitého nádorového markeru je třeba zvážit i očekávané počty požadovaných stanovení: V případě malých sérií je výhodnější soustřeďovat vyšetření na vybraných pracovištích. Na jednom typu automatického analyzátoru lze používat obvykle diagnostické soupravy pouze od jednoho výrobce – a to s sebou přináší vazbu na jeho nabídku vyšetřovacích souprav. Dlouhodobé sledování vyžaduje nestřídat soupravy od různých výrobců pro jeden marker.

Měření hladiny nádorového markeru je třeba provádět pomocí technologie určené k in vitro diagnostice, kalibrované dle pokynů dodavatele technologie. Metodika musí být v souladu s Nařízením vlády č. 453/2004 Sb. ze dne 7. července 2004 v platném znění, kterým se stanoví technické požadavky na diagnostické zdravotnické prostředky in vitro a pravidelně sledována vnitřní kontrolou kvality [72]. Pracoviště by mělo disponovat příslušně kvalifikovaným personálem znalým problematiky a pravidelně se účastnit procesu externího hodnocení kvality. Laboratoř by měla být schopna dlouhodobě zajistit výsledek o pokud možno stejné analytické nejistotě a vysoké reprodukovatelnosti. Pokud je změnu technologie nutné v praxi realizovat, je třeba nejprve provést srovnávací sérii měření na dostatečném množství konkrétních patientských vzorků pomocí obou souprav, aby laboratoř získala data o chování nové soupravy v konkrétních podmínkách (tzv. rebaselining) [9].

Dodržování pravidel správné laboratorní práce při vyšetřování nádorových markerů je obzvláště důležité vzhledem ke značné finanční náročnosti vyšetření.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Vzhledem k omezenému rozsahu diplomové práce jsem se v experimentální části zaměřila pouze na několik nejčastěji vyšetřovaných nádorových markerů v laboratoři AXIS-CZ Hradec Králové, s.r.o. Z každé skupiny jsem vybrala několik příkladů:

- Onkofetální antigeny: AFP - stanovení imunochemicky CLIA
- Tkáňově či orgánově specifické antigeny: PSA, CA125 – stanovení imunochemicky CLIA
- Nespecifické antigeny a tumorové markery: Ferritin – stanovení imunochemicky CLIA; LD – stanovení fotometricky

Ke zpracování experimentální části jsem použila laboratorní příručku a standardní operační postupy biochemicko-hematologické laboratoře AXIS.

Všechny výše zmíněné nádorové markery (kromě LD) jsou stanovovány na automatickém analyzátoru IMMULITE 2000 výrobce Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, USA.

IMMULITE 2000 (obr. č. 25) je imunochemický analyzátor používající heterogenní enzymoimunostanovení se značením alkalickou fosfatázou a detekcí tímto enzymem vyvolaného luminiscenčního záření. Záření je produkováno tak, že působením alkalické fosfatázy na substrát dojde k odštěpení fosfátového aniontu a rozpadu nestabilního derivátu za vyzáření světla vlnové délky 425 – 500 nm. Je to plně uzavřený systém využívající pouze diagnostiku firmy Siemens Medical Solutions Diagnostics určenou pro tento analyzátor. Provádět lze sendvičové i kompetitivní uspořádání s kvantitativním nebo kvalitativním výsledkem. Stanovení je možné provádět prakticky ve všech tělních tekutinách, v závislosti na jednotlivých analytech.

Specifikace přístroje:

- Rychlost: až 200 analýz za hodinu
- Doba analýzy: 35 nebo 65 nebo 125 minut
- Spotřeba vzorku: 0,005 – 0,100 ml dle analytu
- Ostatní spotřeba na 1 analýzu: voda – 7,5 ml

promývací roztok koncentrát – 0,1 ml

substrát – 0,2 ml

- Technické údaje: elektrický příkon 1200 W
hmotnost 300 kg



Obr. č. 25: IMMULITE 2000 (převzato z [71])

5.1 Onkofetální antigeny

5.1.1 Stanovení koncentrace AFP v séru imunochemicky (CLIA) na analyzátoru IMMULITE 2000

Teorie, použití, preanalytické požadavky

Podrobně popsáno v kapitole 3.1.1 v teoretické části diplomové práce.

Princip

Stanovení je založeno na sekvenční imunochemické reakci. AFP se v prostředí pufovaného roztoku s obsahem sérových bílkovin váže jedním epitopem na monoklonální myší protilátku imobilizovanou na polystyrenové kuličce.

Reakce probíhá 30 minut při 37°C. Po odstředivém odstranění nezreagovaného materiálu a promytí reaguje druhý epitop AFP s polyklonální králičí protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou. Reakce probíhá 30 minut při 37°C. Po odstranění nezreagovaného materiálu centrifugací a promytí se přidá substrát fosforečný ester adamantyl dioxetanu, který hydrolyzuje stykem s alkalickou fosfatázou za vzniku nestabilního meziprojektu. Ten se ihned rozpadá za produkce záření, které se detekuje luminometrem. Intenzita vzniklého záření je přímo úměrná koncentraci AFP ve vyšetřovaném vzorku.

Inkubační cykly: 2 x 30 minut

Potřebný objem vzorku: 10 µl (+ mrtvý objem 150 µl) séra

Odběr primárního vzorku a transport

Speciální příprava pacienta ani dieta není nutná, pro obvyklé vyšetřování je vhodný odběr ráno, nalačno. Odběr se provádí ze žíly, za použití zkumavky pro biochemický odběr, bezprostředně po odběru je nutno vzorek odstředit.

Hemolyzované vzorky mohou být známkou nesprávného zacházení s preparátem ještě před přijetím do laboratoře, proto by výsledky měly být interpretovány s obezřetností.

Stabilita vzorku séra je 7 dní při 2 – 8°C, 2 měsíce při minus 20°C.

Znaky analytické metody

- Analytická proveditelnost: Časová dostupnost výsledku - výsledky jsou k dispozici 3 hodiny od přijetí materiálu, statimové vyšetření do 2 hodin.
- Linearita: Test je lineární v rozmezí hodnot 0 – 300 IU/ml.
- Přesnost: Při zavádění metodiky v laboratoři AXIS byly vzorky opakovaně stanovovány duplicitně v průběhu 20ti dní, celkem 40 cyklů a 80 replikátů (tab. č. 3).

Tab. č. 3: Stanovení přesnosti metodiky pro stanovení AFP v laboratoři AXIS

Střední hodnota	V sérii		Celkem	
	SD	CV%	SD	CV%
0,80	0,05	6,3	0,10	12,0
2,8	0,10	3,6	0,20	7,1
13,0	0,27	2,1	0,72	5,5
31,0	0,82	2,7	1,71	5,5
44,0	0,96	2,2	2,1	4,8
60,0	1,5	2,5	2,7	4,5
182,0	4,4	2,4	8,4	4,6

Pro účely této diplomové práce jsem stanovovala AFP ve vzorku zdravého pacienta, opakovaně 15krát v průběhu 1 dne pro ověření reprodukovatelnosti (tab. č. 4).

Tab. č. 4: Ověření reprodukovatelnosti metodiky pro stanovení AFP v laboratoři AXIS

Číslo měření	Hodnota AFP (IU/ml)
1	1,26
2	1,18
3	1,17
4	1,16
5	1,21
6	1,14
7	1,26
8	1,20
9	1,23
10	1,23
11	1,24
12	1,27
13	1,24
14	1,08
15	1,17
Průměrná hodnota	1,203
Směrodatná odchylka	0,053
Variační koeficient (%)	4,383

- Citlivost: 0,2 IU/ml
- Limitace - interference: následující sledované interferující látky nezpůsobují v metodě významnou interferenci
 - Bilirubin: přítomnost bilirubinu má malý statisticky významný vliv.

- Hemolýza: přítomnost hemoglobinu v koncentracích do 1,92 g/l nemá v rámci přesnosti stanovení žádný vliv na výsledky.
 - Lipémie: přítomnost triglyceridu v koncentracích do 33,9 mmol/l nemá v rámci přesnosti stanovení žádný vliv na výsledky.
- Toleranční rozpětí chyb při mezilaboratorních kontrolních cyklech organizovaných firmou SEKK bylo v letech 2007 - 2009 20%.

Referenční a varovná rozmezí

Výrobce udává referenční fyziologické rozmezí, s tím, že výsledek závisí na věku, pohlaví, dietě a geografické poloze. Je proto vhodné, aby si každá laboratoř určila vlastní referenční rozmezí pro svou vlastní populaci.

Referenční rozmezí daná Hematologickou a biochemickou laboratoří AXIS-CZ Hradec Králové, s.r.o.: 0 – 5 IU/ml

Přístroje a pomůcky

Imunochemický analyzátor Immulite 2000, laboratorní odstředivka, automatické pipety

Reagencie

Skladování reagensů probíhá při teplotě 2 – 8°C, likvidace musí probíhat v souladu s platnými předpisy.

Balení soupravy pro stanovení AFP L2KAP2 (je složeno z jednotlivých komponent, ty představují ucelenou sadu). Pro stanovení jsou zapotřebí také štítky s příslušnými čárovými kódy.

Souprava L2KAP2 obsahuje:

- **AFP zásobník s kuličkami (L2AP12)** - zásobník je opatřen čárovým kódem, obsahuje 200 kuliček potažených monoklonální myší protilátkou proti AFP. Protilátka je stabilní při 2 – 8°C do data expirace. Souprava L2KAP2 obsahuje 1 balení L2AP12.
- **AFP reagentie (L2APA2)** - reagentie je opatřena čárovým kódem,

11,5 ml proteinového pufru /zvířecího sérového matrixu a 11,5 ml z alkalické fosfatázy (z telecího střeva) konjugované s polyklonální králičí protilátkou proti AFP v pufru s konzervačním prostředkem. Reagencie je stabilní při teplotě 2 – 8°C do data expirace. Souprava L2KAP2 obsahuje 1 balení L2APA2. Před použitím je nutno utrhnout vršek štítku v perforovaném místě, ale nesmí se poškodit čárový kód. Z vrchu nádoby se odstraní uzavírací fólie, posuvný uzávěr se zaklapne do ramp na víčku reagentie.

- **AFP adjustory (LAPL, LAPH)** - dvě ampulky, každá o objemu 2,0 ml s nízkou (označena A) a vysokou (označena B) koncentrací AFP v hovězím sérovém matrixu. Stabilní 30dnů po otevření po rekonstituci při teplotě 2 – 8°C nebo rozdělené na alikvotní části 6 měsíců při minus 20°C. Souprava L2KAP2 obsahuje 1 balení LAPL a LAPH .

Materiál dodávaný zvlášť:

- **L2SUBM:** Chemiluminiscenční substrát (Chemiluminiscent substrate)
- **L2PWSM:** Promývací roztok (Probe cleaning kit)

Spotřební materiál

Zkumavky vak.BIO, zkumavky BIO MPT A24, špičky k automatickým pipetám BSR 001, špičky k automatickým pipetám BSR 002, kepy HITACHI BSA 031, Pasteur. pipety BSV 134, mikrozkm. Eppendorf bílé BSA 022

Příprava k činnosti

Před zahájením vlastní činnosti zkontroluji zásobu a stav reagentie v reagenčním kruhu analyzátoru. Je také nutné nejméně jednou za směnu (nejlépe s každou měřenou sérií vzorků) provést kontrolu jakosti pomocí kontrolních materiálů. V případě, že výsledky kontrol neodpovídají nastavenému tolerančnímu rozmezí, musí se provést nová adjustace (kalibrace), eventuálně nalézt a odstranit případné závady a následně zopakovat měření kontroly jakosti.

V pravidelných intervalech se také musí provést předepsaná údržba

analyzátoru dle návodu v manuálu pro IMMULITE 2000.

Stručný popis pracovního postupu

Po stisknutí tlačítka nosiče zkumavek A – F na obrazovce dojde k natočení karuselu tak, že je možno stojánek po otevření víka vzorkového karuselu vyjmout. Umístím rutinní analyzované vzorky séra v kepech HITACHI v naplánovaném pořadí do vzorkových šedých stojánků, vložím zpět do karuselu a zavřu víko. Pokud je analyzátor ve stavu PAUSE nebo STOP, stisknu ikonu RUN. Tím se zahájí analýza, která dále probíhá automaticky. Požadavky na analýzy se do analyzátoru mohou přenášet počítačovou sítí prostřednictvím laboratorního informačního systému, nebo je mohu zadat ručně pomocí klávesnice řídicího počítače analyzátoru.

Výsledky se z analyzátoru automaticky přenášejí zpět do laboratorního informačního systému. Po analytické a lékařské kontrole jsou vydány požadujícímu pracovišti.

Adjustace (kalibrace)

Před adjustací na testovací zkumavky nalepím příslušné štítky (dodané se soupravou) tak, aby z nich zabudovaný snímač mohl přečíst čárové kódy.

Adjustory se dodávají v tekutém stavu v setu současně s reagensy.

Výrobce doporučuje skladování v lednici při 2 - 8°C, v tom případě jsou stabilní až do doby expirace vyznačené na každé lahvičce. Otevřený a rekonstituovaný rozpipetovaný materiál v alikvotech je stabilní maximálně 30 dnů při uložení v mrazáku (při minus 18 až minus 20°C).

Dokumentace, zpracování dat a vydávání výsledků

Automatický analyzátor vyhodnotí koncentraci AFP ve vzorku podle platné adjustace.

Výsledek se průběžně zobrazuje na monitoru řídicího počítače analyzátoru a současně se automaticky přenáší do laboratorního informačního systému LIS MIKYSKA. Mimo to je možný průběžný tisk výsledků na připojené tiskárně

analyzátoru. Následuje analytická a lékařská kontrola výsledků a jejich výdej.

Výsledky se vydávají v IU/ml na jedno desetinné místo. Předávají se (po splnění všech požadavků na stanovení a po výše zmíněné analytické a lékařské kontrole) na analýzu požadující pracoviště, buď v elektronické formě pomocí počítačové sítě nebo v papírové formě spolu s uvedením fyziologických hodnot eventuálně s vyznačením jejich překročení.

Všechny výsledky se archivují v elektronické formě v laboratorním informačním systému a mimo to ještě v papírové formě v jednou denně vytištěné hlavní knize laboratoře.

Interpretace výsledků

Zvýšené hodnoty AFP se mohou vyskytovat u nenádorových onemocnění - u akutní virové hepatitidy, chronické hepatitidy, jaterní cirhózy, hereditární tyrosinemie. Dále u maligních onemocnění nacházíme zvýšené hodnoty AFP u hepatocelulárního karcinomu, karcinomu vaječníku, karcinomu GIT, pulmonárního karcinomu, ale zejména u neseminomatózního karcinomu varlete, pro který slouží AFP jako marker úspěšnosti resekce, pooperační léčby i rekurence nádoru. Stanovení koncentrace AFP v kombinaci s dalšími vyšetřeními se využívá pro prenatální diagnostiku trisomie 21 (Downův syndrom). Průměrné koncentrace AFP jsou u těhotných, jejichž plody jsou postiženy, asi o 1/3 nižší než průměrné koncentrace u těhotných se zdravými plody. Koncentrace hCG (nejvíce používané doplňkové vyšetření) jsou u matek dětí s Downovým syndromem naopak vyšší než při fyziologickém těhotenství. Riziko postižení Downovým syndromem se pak vypočítává z výsledků vyšetření obou markerů, eventuelně se dále kombinuje s rizikem vyplývajícím z věku matky.

Řízení jakosti

Kontrolu kvality pomocí kontrolních referenčních materiálů je zapotřebí provádět minimálně 1x za směnu a dále například vždy po adjustaci, po servisním zásahu spojeném s výměnou významné součásti analyzátoru, při jakékoliv

pochybnosti o správnosti analýzy vzorků, atd.

Ke kontrole a řízení jakosti se používá kontrolní materiál na bázi lidského séra s určenými koncentracemi pro uvedený princip metody:

- **TMC Tumor Marker Controls** označené jako **TMCO**. Tato kontrola se používá ve třech hladinách: level 1 (nízká), level 2 (střední), level 3 (vysoká). Například TMCO level 1 má u šarže 028 hodnotu koncentrace AFP 8,0 IU/ml, level 2 má u šarže 028 hodnotu koncentrace AFP 30,0 IU/ml, level 3 má u šarže 028 hodnotu koncentrace AFP 66,0 IU/ml. Kontrolní séra jsou dodávána v lyofilizované formě (1 balení obsahuje 6 ks lahviček á 5 ml o 3 různých hladinách koncentrací analytu), před použitím je nutné provést rekonstituování.

Doporučený postup rekonstituování lyofilizovaného materiálu:

1. Opatrně otevřít lahvičku a vyjmout gumovou vložku. Přitom věnovat maximální pozornost zabránění ztrátám lyofilizovaného materiálu zachyceného na gumové vložce.
2. Přidat skleněnou nebo automatickou pipetou, určenou pouze pro ředění standardních a kontrolních roztoků, do lahvičky přesně 5,0 ml vody pro injekce (Aqua pro injectione Ardeapharma)
3. Uzavřít lahvičku gumovou vložkou a po 30 minutách opatrně promíchat otáčením a převracením (netřepat!) až do kompletního rozpuštění obsahu. Počkat alespoň 2 hodiny, než se takto rekonstituovaný materiál použije ke kontrole.

Lyofilizovaná kontrolní séra se uchovávají v lednici při 2 - 8°C. V tom případě jsou stabilní až do doby expirace vyznačené na každé lahvičce. Rekonstituovaná (a eventuálně rozpipetovaná) uzavřená kontrolní séra jsou pro stanovení koncentrace AFP stabilní 7 dní při uchovávání v lednici při teplotě 2 - 8°C a stabilní maximálně 30 dnů při uložení v mrazáku (při minus 18 až minus 20°C).

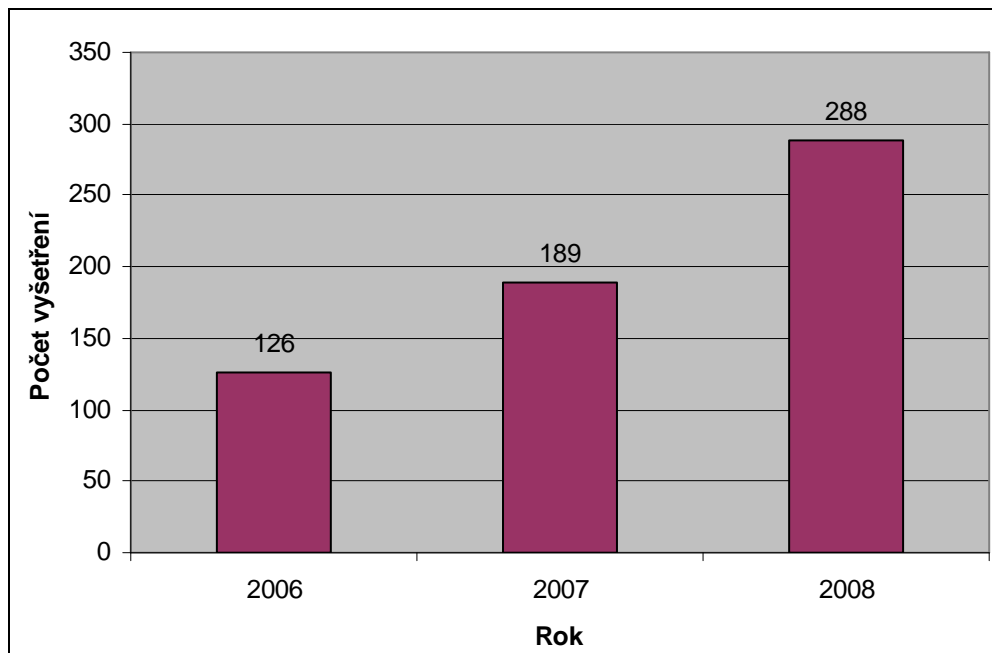
Výsledky získávané při analýzách kontrolních materiálů se průběžně zaznamenávají do kontrolních regulačních diagramů. V regulačních diagramech jsou mimo průměrných hodnot kontrolního materiálu vyznačeny i varovné

(průměr \pm 2 x směrodatná odchylka) a regulační (průměr \pm 3 x směrodatná odchylka) meze. Eventuelní překročení těchto mezí znamená, že se analýza vzorků pacientů nemůže provést, metodu a postup je v tomto případě nutné prověřit a po odstranění zjištěné závady analýzu kontrolních materiálů zopakovat.

Součástí kontroly a řízení jakosti je pravidelná účast na mezilaboratorních kontrolách kvality organizovaných ve vhodných intervalech například firmou SEKK .

Statistika vyšetření AFP v laboratoři AXIS

Narůstající význam stanovení AFP dokládá i statistika tohoto vyšetření v Hematologické a biochemické laboratoři AXIS-CZ Hradec Králové, s.r.o. v letech 2006 až 2008 (obr. č. 26)



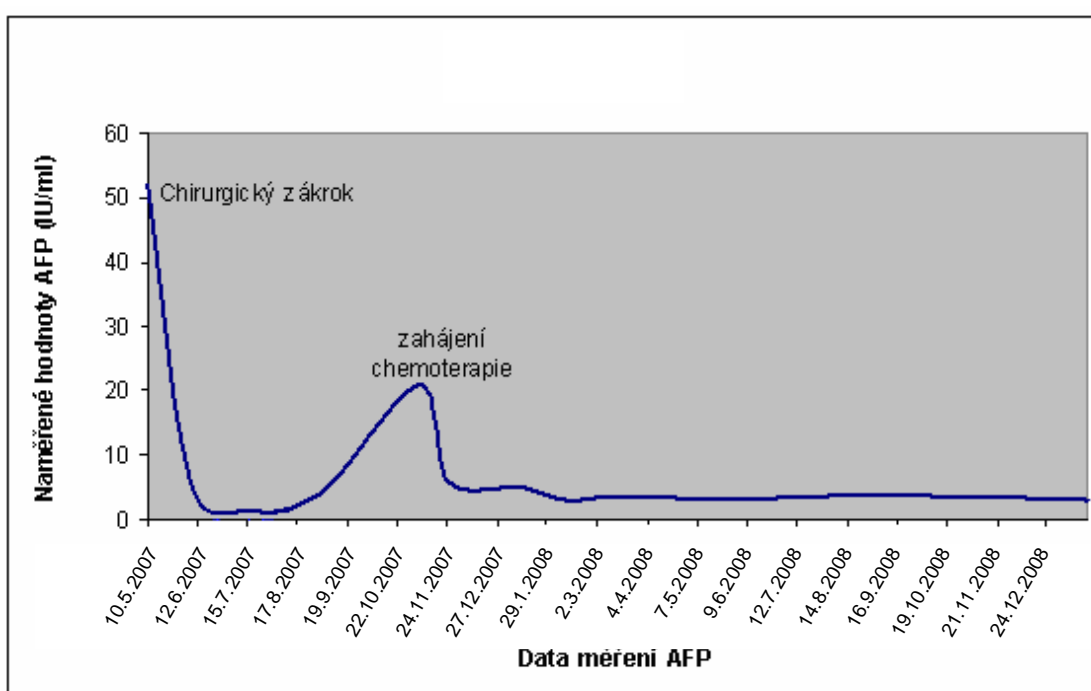
Obr. č. 26: Statistika vyšetření AFP v letech 2006 - 2008

Z uvedeného grafu vyplývá i narůstající význam těchto vyšetření, za poslední tři roky stoupl počet vyšetření o 128,6%.

Příklad č.1

Vybraná kazuistika z databáze laboratoře AXIS-CZ - sledování průběhu onemocnění a efekt léčby u generalizovaného karcinomu varle:

Pacient, muž, 52 let, sledován v laboratoři AXIS-CZ v souvislosti s diagnózou karcinomu varle; 5/2007 proveden chirurgický zákrok (levostranná orchiektomie), předoperační patologické hodnoty AFP. Od 11/2007 do 6/2008 chemoterapie. AFP již od 3/2008 ve fyziologických hodnotách. Pacient nyní monitorován se stále fyziologickými hodnotami AFP (obr. č. 27).



Obr. č. 27: Kazuistika AFP

5.2 Tkáňově či orgánově specifické antigeny

5.2.1 Stanovení koncentrace celkového PSA v séru imunochemicky (CLIA) na analyzátoru Immulite 2000

Teorie, použití, preanalytické požadavky

Podrobně popsáno v kapitole 3.2.1 v teoretické části diplomové práce.

Princip

Stanovení je založeno na sekvenční imunochemické reakci. PSA se v prostředí pufovaného roztoku s obsahem sérových bílkovin váže jedním epitopem na monoklonální myší protilátku imobilizovanou na polystyrenové kuličce. Po odstředivém odstranění nezreagovaného materiálu a promytí reaguje druhý epitop PSA s polyklonální kozí protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou. Reakce probíhá 30 minut při 37°C. Po odstranění nezreagovaného materiálu centrifugací a promytím se přidá substrát fosforečný ester adamantyl dioxetanu, který hydrolyzuje stykem s alkalickou fosfatázou za vzniku nestabilního meziprojektu. Ten se ihned rozpadá za produkce záření, které se detekuje luminometrem. Intenzita vzniklého záření je přímo úměrná koncentraci PSA ve vyšetřovaném vzorku.

Inkubační cykly: 1 x 30 minut

Potřebný objem vzorku: 10 µl (+ mrtvý objem 150 µl)séra

Odběr primárního vzorku a transport

Stanovení se provádí v séru. Speciální příprava pacienta ani dieta není nutná, pro obvyklé vyšetřování je vhodný odběr ráno, nalačno. Odběr se provádí ze žíly, za použití zkumavky pro biochemický odběr, bezprostředně po odběru je nutno vzorek odstředit.

Vzorky je třeba odebírat před biopsií, prostatektomií nebo prostatickou masáží.

Manipulace s předstojnou žlázou může způsobit zvýšené hodnoty koncentrace PSA, které přetrvávají i tři týdny. Výsledky falešně zvyšuje též retence moče. Manipulace s materiálem - dle běžných zásad práce s biologickým infekčním materiálem. Stabilita vzorku je 48 hodin při 2 – 8°C, déle p ři minus 20°C.

Znaky analytické metody

- Analytická proveditelnost: Časová dostupnost výsledku - výsledky jsou k dispozici 3 hodiny od přijetí materiálu, statimové vyšetření do 1 hodiny.
- Linearita: Test je lineární v rozmezí hodnot 0,04 -150 µg/l.
- Přesnost: Při zavádění metodiky v laboratoři AXIS byly vzorky opakovaně stanovovány duplicitně v průběhu 20ti dní, celkem 40 cyklů a 80 replikátů (tab. č. 5).

Tab. č. 5: Stanovení přesnosti metodiky pro stanovení PSA v laboratoři AXIS

Střední hodnota	V sérii		Celkem	
	SD	CV%	SD	CV%
2,8	0,10	3,6	0,14	5,0
7,4	0,23	3,1	0,36	4,9
11,4	0,34	3,0	0,60	5,3
25	0,70	2,8	1,1	4,4
65	1,4	2,2	2,5	3,9
126	3,2	2,5	4,7	3,7

Pro účely této diplomové práce jsem stanovovala PSA ve vzorku zdravého pacienta, opakovaně 13krát v průběhu 1 dne pro ověření reprodukovatelnosti (tab. č. 6).

Tab. .č. 6: Ověření reprodukovatelnosti metodiky pro stanovení PSA v laboratoři AXIS

Číslo měření	Hodnota PSA (ug/L)
1	0,959
2	0,973
3	0,999
4	1,01
5	1,02
6	0,958
7	1,09
8	0,865
9	1,05
10	0,969
11	1
12	1,07
13	1,07
Průměrná hodnota	1,003
Směrodatná odchylka	0,061
Variační koeficient (%)	6,052

- Citlivost: 0,04 µg/l
- Limitace - interference: následující sledované interferující látky nezpůsobují v metodě významnou interferenci
 - Bilirubin: přítomnost bilirubinu v koncentracích do 342 µmol/l nemá v rámci přesnosti stanovení žádný vliv na výsledky.
 - Hemolýza: přítomnost červených krvinek oddělných od plazmy v koncentracích do 30 µl/ml nemá v rámci přesnosti stanovení žádný vliv na výsledky.
 - Lipémie: přítomnost triglyceridů v koncentracích do 56,5 mmol/l nemá v rámci přesnosti stanovení žádný vliv na výsledky.
- Specifická: PSA je silně specifický se zvláště nízkou zkříženou reaktivitou na ostatní přirozeně se vyskytující sloučeniny a chemoterapeutické prostředky, které se mohou objevit ve vzorcích pacientů.
- Toleranční rozpětí chyb při mezilaboratorních kontrolních cyklech organizovaných firmou SEKK bylo v letech 2007 - 2009 15%.

Referenční a varovná rozmezí

Výrobce udává referenční fyziologické rozmezí, s tím, že výsledek závisí na věku, pohlaví, dietě a geografické poloze. Je proto vhodné, aby si každá laboratoř určila vlastní referenční rozmezí pro svou vlastní populaci.

Referenční rozmezí daná Hematologickou a biochemickou laboratoří AXIS-CZ Hradec Králové, s.r.o.: 0 – 4 µg/l

Přístroje a pomůcky

Viz kapitola 5.1.1

Reagencie

Balení soupravy pro stanovení PSA L2KPS2 (je složeno z jednotlivých komponent, ty představují ucelenou sadu). Pro stanovení jsou zapotřebí štítky s čárovými kódy.

Souprava L2KPS2 obsahuje:

- **PSA zásobník s kuličkami (L2PS12)** - zásobník je opatřen čárovým kódem, obsahuje 200 kuliček potažených polyklonální kozí protilátkou anti-PSA. Protilátka je stabilní při 2 – 8°C do expirace.
- **PSA reagencie (L2PSA2)** - reagencie je opatřena čárovým kódem, obsahuje 11,5 ml alkalické fosfatázy (z telecího střeva) konjugované s monoklonální myší protilátkou anti-PSA v pufru, s konzervačním prostředkem. Reagenci je stabilní při teplotě 2 – 8°C do expirace. Před použitím je nutno utrhnout vršek štítku v perforovaném místě, ale nesmí se poškodit čárový kód. Z vrchu nádoby se odstraní uzavírací fólie, posuvný uzávěr se zaklapne do ramp na víčku reagencie.
- **PSA adjustory (LPSL LPSH)** - dvě ampulky každá o obsahu 1,5 ml s nízkou (označena A) a vysokou (označena B) koncentrací PSA v kuřecím séru/ pufrovaném matrixu. Stabilní 30dnů po otevření při teplotě 2 – 8°C nebo rozdělené na alikvotní části 6 měsíců při minus 20°C.

Materiál dodávaný zvlášť:

- **L2SUBM:** Chemiluminiscenční substrát (Chemiluminiscent substrate)
- **L2PWSM:** Promývací roztok (Probe cleaning kit)

Spotřební materiál; příprava k činnosti; stručný popis pracovního postupu; adjustace

Viz kapitola 5.1.1

Dokumentace, zpracování dat a vydávání výsledků

Analyzátor vyhodnotí koncentraci PSA ve vzorku podle platné adjustace. Výsledky se vydávají v $\mu\text{g/l}$ s přesností na jedno desetinné místo. Dále viz kapitola 5.1.1.

Interpretace výsledků

Samotné stanovení PSA v séru není vhodné pro screening rakoviny prostaty, protože zvýšená koncentrace PSA se rovněž objevuje u pacientů s benigní prostatickou hypertrofií (BPH). Rovněž se nedoporučuje jako vodítko při určování stádia onemocnění. Kombinace měření PSA a ultrasonografického rektálního vyšetření, v případě patologického nálezu může představovat lepší metodu zjištění rakoviny prostaty než samotné rektální vyšetření. Stanovení PSA má při odhalení rakoviny prostaty oproti digitálnímu rektálnímu vyšetření nebo ultrasonografii několik výhod. Výsledek je objektivní, vyjádřený kvantitativně a vyjádřený nezávisle na dovednostech vyšetřujícího. Způsob vyšetření je rovněž pro pacienty přijatelnější než jiné metody.

Stanovení PSA je užitečné při detekci metastatického nebo přetrvávajícího onemocnění u pacientů po chirurgickém zákroku nebo léčbě rakoviny prostaty. Přetrvávající zvýšená hladina PSA po léčbě, nebo nárůst koncentrace PSA vůči stavu před léčbou, jsou znaky recidivy nebo residuálního onemocnění. Proto je stanovení PSA obecně akceptováno jako pomůcka při péči o pacienty s rakovinou prostaty.

American Cancer Society (Americká onkologická společnost) navrhla, aby se 50ti letým mužům a rovněž mladším, ale rizikovějším pacientům, každoročně nabídlo stanovení PSA pomocí krevních testů a digitální rektální vyšetření.

Pokud se hladina PSA nachází mezi 4 – 10 µg/l, je vhodné stanovit též fPSA. Hodnotí se pak poměr koncentrací fPSA/PSA x 100 (%). Pro získaný výsledek platí pak toto hodnocení: maligní nádor 0 – 15%; hraniční hodnoty 15 – 20%; benigní onemocnění 20% a více.

Zvýšené hladiny PSA se mohou objevovat i u nemocných s jiným maligním nádorovým onemocněním, např. s karcinomem plic, kolorektálním karcinomem, karcinomem prsu, hepatocelulárním karcinomem a karcinomem nadledvin.

Řízení jakosti

Kontrolu kvality pomocí kontrolních referenčních materiálů je zapotřebí provádět minimálně 1x za směnu a dále například vždy po adjustaci, po servisním zásahu spojeném s výměnou významné součásti analyzátoru, při jakékoliv pochybnosti o správnosti analýzy vzorků, atd.

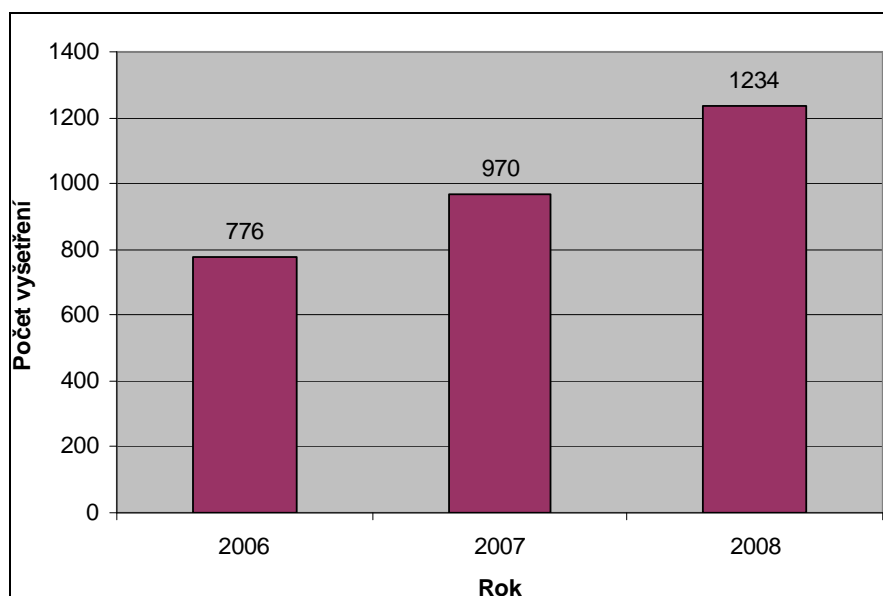
Ke kontrole a řízení jakosti používáme kontrolní materiál na bázi lidského séra s určenými koncentracemi pro uvedený princip metody:

- **TMC Tumor Marker Controls** označené jako **TMCO**. Tato kontrola se používá ve třech hladinách: level 1 (nízká), level 2 (střední), level 3 (vysoká). Například TMCO level 1 má u šarže 028 hodnotu koncentrace PSA 4,4 µg/l, level 2 má u šarže 028 hodnotu koncentrace PSA 9,5 µg/l, level 3 má u šarže 028 hodnotu koncentrace PSA 30 µg/l. Kontrolní séra jsou dodávána v lyofilizované formě (1 balení obsahuje 6 ks lahviček á 5 ml o 3 různých hladinách koncentrací analytu), před použitím je nutné provést rekonstituování (viz doporučený postup rekonstituování lyofilizovaného materiálu, kapitola 5.1.1).

Součástí kontroly a řízení jakosti je pravidelná účast na mezilaboratorních kontrolách kvality organizovaných ve vhodných intervalech například firmou SEKK .

Statistika vyšetření celkového PSA v laboratoři AXIS

Z níže uvedené statistiky vyšetření celkového PSA v Hematologické a biochemické laboratoři AXIS-CZ Hradec Králové, s.r.o. v letech 2006 až 2008 vyplývá narůstající význam tohoto vyšetření, související pravděpodobně i se stále větším výskytem karcinomu prostaty. Počet vyšetření celkového PSA během posledních 3 let stoupl o 59% (obr. č 28).



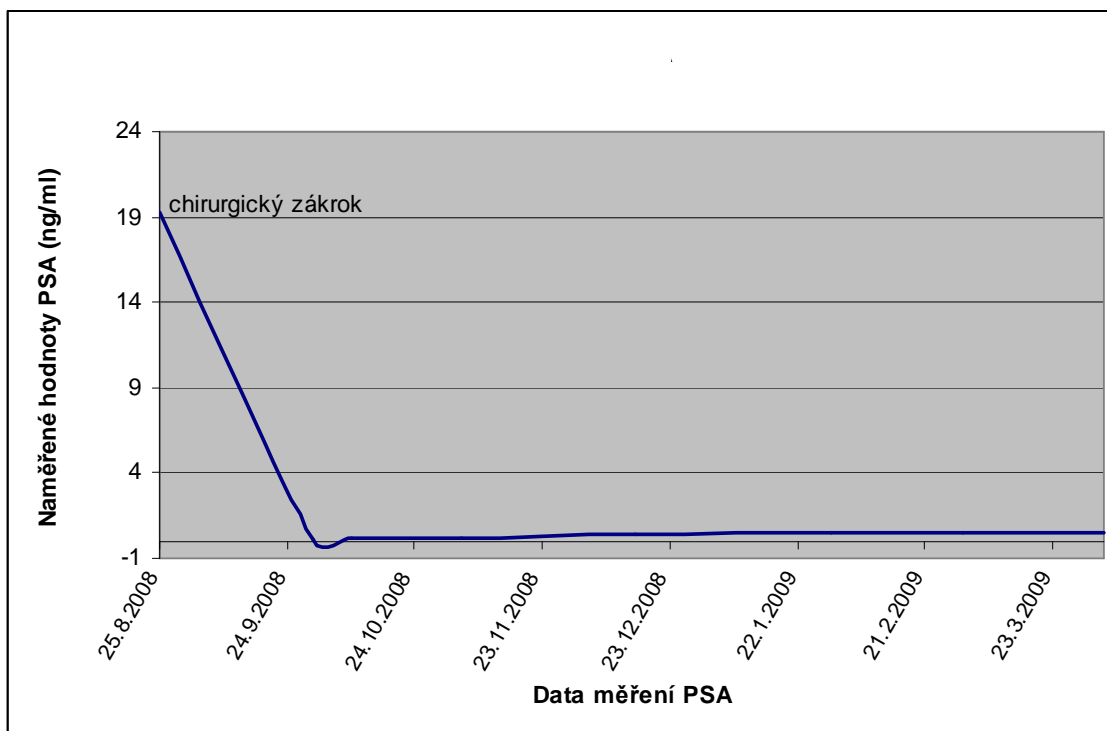
Obr. č. 28: Statistika vyšetření celkového PSA v letech 2006 - 2008

Příklad č.2

Vybraná kazuistika z databáze laboratoře AXIS-CZ - sledování průběhu onemocnění a efekt léčby u karcinomu prostaty:

Pacient, muž, 59let, vyšetřován v laboratoři AXIS-CZ v souvislosti s diagnózou karcinomu prostaty; 8/2008 proveden chirurgický zákrok (transuretrální resekce prostaty), předoperační patologické hodnoty PSA. Po operaci je hladina PSA

u pacienta monitorována každý měsíc a dle naší databáze se nachází ve fyziologických hodnotách (obr. č. 29).



Obr. č. 29: Kazuistika PSA

5.2.2 Stanovení koncentrace CA125 v séru imunochemicky (CLIA) na analyzátoru Immulite 2000

Teorie, použití, preanalytické požadavky

Podrobně popsáno v kapitole 3.2.3 v teoretické části diplomové práce.

Princip

Stanovení je založeno na sekvenční imunochemické reakci. Ke stanovení CA125 na analyzátoru IMMULITE 2000 se používají myší monoklonální protilátky k navázání a králičí polyklonální protilátky k detekci antigenu CA125.

CA125 se váže jedním epitopem na monoklonální myší protilátku imobilizovanou na polystyrenové kuličce a druhý epitop CA125 reaguje s polyklonální králičí protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou. Reakce probíhá 60 minut při 37°C. Po 30 minutách inkubace se k reakční směsi přidá pufr. Po odstředivém odstranění nezreagovaného materiálu a promytí se přidá substrát fosforečný ester adamantyl dioxetanu, který hydrolyzuje stykem s alkalickou fosfatázou za vzniku nestabilního meziprojektu. Ten se ihned rozpadá za produkce záření, které se detekuje luminometrem. Intenzita vzniklého záření je přímo úměrná koncentraci CA125 ve vyšetřovaném vzorku.

Inkubační cykly: 2 x 30 minut

Potřebný objem vzorku: 50 µl (+ mrtvý objem 150 µl) séra

Odběr primárního vzorku a transport

Speciální příprava pacienta ani dieta není nutná, pro obvyklé vyšetřování je vhodný odběr ráno, nalačno. Odběr se provádí ze žíly, za použití zkumavky pro biochemický odběr, bezprostředně po odběru je nutno vzorek odstředit.

Hemolyzované vzorky mohou být známkou nesprávného zacházení s preparátem ještě před přijetím do laboratoře, proto by výsledky měly být interpretovány s obezřetností.

Dle běžných zásad práce s biologickým infekčním materiálem. Stabilita vzorku séra je 7 dní při 2 – 8°C, 2 měsíce při minus 20°C.

Znaky analytické metody

- **Analytická proveditelnost:** Časová dostupnost výsledku - výsledky jsou k dispozici 3 hodiny od přijetí materiálu, statimové vyšetření do 2 hodin.
- **Linearita:** Test je lineární v rozmezí hodnot 0 - 500 IU/ml.
- **Přesnost:** Při zavádění metodiky v laboratoři AXIS byly vzorky opakovaně stanovovány duplicitně v průběhu 20ti dní, celkem 40 cyklů a 80 replikátů (tab. č. 7).

Tab. č. 7: Stanovení přesnosti metodiky pro stanovení CA125 v laboratoři AXIS

Střední hodnota	V sérii		Celkem	
	SD	CV%	SD	CV%
5,6	0,22	3,9	0,61	11,0
23,0	1,1	4,8	1,2	5,2
41,0	1,8	4,4	1,9	4,6
92,0	3,7	4,0	4,7	5,1
111,0	4,5	4,1	5,0	4,5
184,0	8,2	4,5	9,2	5,0
292,0	12,0	4,1	15,0	5,1
394,0	20,0	5,1	21,0	5,3

Pro účely této diplomové práce jsem stanovovala CA125 ve vzorku nemocné pacientky, opakovaně 13krát v průběhu 1 dne pro ověření reprodukovatelnosti (tab. č. 8).

Tab. .č. 8: Ověření reprodukovatelnosti metodiky pro stanovení CA125 v laboratoři AXIS

Číslo měření	Hodnota CA125 (IU/mL)
1	61,4
2	64,2
3	68,5
4	61,9
5	65,7
6	62,4
7	68,0
8	64,1
9	62,9
10	61,0
11	65,8
12	67,2
13	63,6
Průměrná hodnota	64,362
Směrodatná odchylka	2,501
Variační koeficient (%)	3,886

- Citlivost: 1 IU/ml
- Limitace - interference: následující sledované interferující látky nezpůsobují v metodě významnou interferenci

- Bilirubin: přítomnost bilirubinu v koncentracích do 342 $\mu\text{mol/l}$ nemá v rámci přesnosti stanovení žádný vliv na výsledky.
 - Hemolýza: přítomnost hemoglobinu v koncentracích do 1,92 g/l nemá v rámci přesnosti stanovení žádný vliv na výsledky.
 - Lipémie: přítomnost triglyceridů v koncentracích do 33,9 mmol/l nemá v rámci přesnosti stanovení žádný vliv na výsledky.
- Toleranční rozpětí chyb při mezilaboratorních kontrolních cyklech organizovaných firmou SEKK bylo v letech 2007 - 2009 17%.

Referenční a varovná rozmezí

Výrobce udává referenční fyziologické rozmezí, s tím, že výsledek závisí na věku, pohlaví, dietě a geografické poloze. Je proto vhodné, aby si každá laboratoř určila vlastní referenční rozmezí pro svou vlastní populaci.

Referenční rozmezí daná Hematologickou a biochemickou laboratoří AXIS-CZ Hradec Králové, s.r.o.: 0 – 21 IU/ml

Přístroje a pomůcky

Viz kapitola 5.1.1

Reagencie

Skladování reagensů probíhá při teplotě 2 – 8°C, likvidace musí probíhat v souladu s platnými předpisy.

Balení soupravy pro stanovení CA125 L2KOP2 (je složeno z jednotlivých komponent, ty představují ucelenou sadu). Pro stanovení jsou zapotřebí štítky s čárovými kódy.

Souprava L2KOP2 obsahuje:

- **OV zásobník s kuličkami (L2OP12)** - zásobník je opatřen čárovým kódem, obsahuje 200 kuliček potažených monoklonální myší protilátkou proti CA125. Protilátka je stabilní při 2 – 8°C do expirace.
- **OV reagencie (L2OPA2)** - reagencie je opatřena čárovým kódem,

obsahuje 11,5 ml alkalické fosfatázy (z telecího střeva) konjugované s polyklonální králičí protilátkou proti CA125 v pufru s konzervačním prostředkem. Reagencie je stabilní při teplotě 2 – 8°C do expirace. Před použitím je nutno utrhnout vršek štítku v perforovaném místě, ale nesmí se poškodit čárový kód. Z vrchu nádoby se odstraní uzavírací fólie, posuvný uzávěr se zaklapne do ramp na víčku reagenty.

- **OV adjustory (LOPL LOPH)** - dvě ampulky s nízkou (označena A) a vysokou (označena B) koncentrací CA 125 v bílkovinné/pufrované matrici zvířecího původu s konzervačním prostředkem. Stabilní 30 dnů po otevření po rekonstituci při teplotě 2 – 8°C nebo rozdělené na alikvotní části 6 měsíců při minus 20°C.

Materiál dodávaný zvlášť:

- **L2SUBM:** Chemiluminiscenční substrát (Chemiluminiscent substrate)
- **L2PWSM:** Promývací roztok (Probe cleaning kit)

Spotřební materiál; příprava k činnosti; stručný popis pracovního postupu; adjustace

Viz kapitola 5.1.1

Dokumentace, zpracování dat a vydávání výsledků

Analyzátor hodnotí koncentraci CA125 ve vzorku podle platné adjustace. Výsledky se vydávají v IU/ml s přesností na jedno desetinné místo. Dále viz kapitola 5.1.1.

Interpretace výsledků

Zvýšená koncentrace CA 125 v séru byla pozorována u benigních afekcí ovárií a endometria, u hepatopatií, pankreatitid, dráždění peritonea, dále fyziologicky v těhotenství nebo v průběhu menstruace.

Zvýšené hladiny CA125 jsou pozorovány u nemocných s těmito druhy maligních nádorových onemocnění: karcinom ovárií, karcinom dělohy, endometria a prsu, karcinom pankreatu, jater, žaludku, kolorektální karcinom, bronchogenní karcinom, metastázy výše uvedených karcinomů do jater.

Screening CA 125 je doporučován u rizikové skupiny žen, a to s dědičným syndromem ovariálního karcinomu. Sérová hladina CA 125 je významná především pro sledování efektu terapie a dlouhodobé monitorování nemocných s karcinomem ovárií, především nemucinózního typu, tj. u serózních a nediferencovaných karcinomů ovária.

Řízení jakosti

Kontrolu kvality pomocí kontrolních referenčních materiálů je zapotřebí provádět minimálně 1x za směnu a dále například vždy po adjustaci, po servisním zásahu spojeném s výměnou významné součásti analyzátoru, při jakékoliv pochybnosti o správnosti analýzy vzorků, atd.

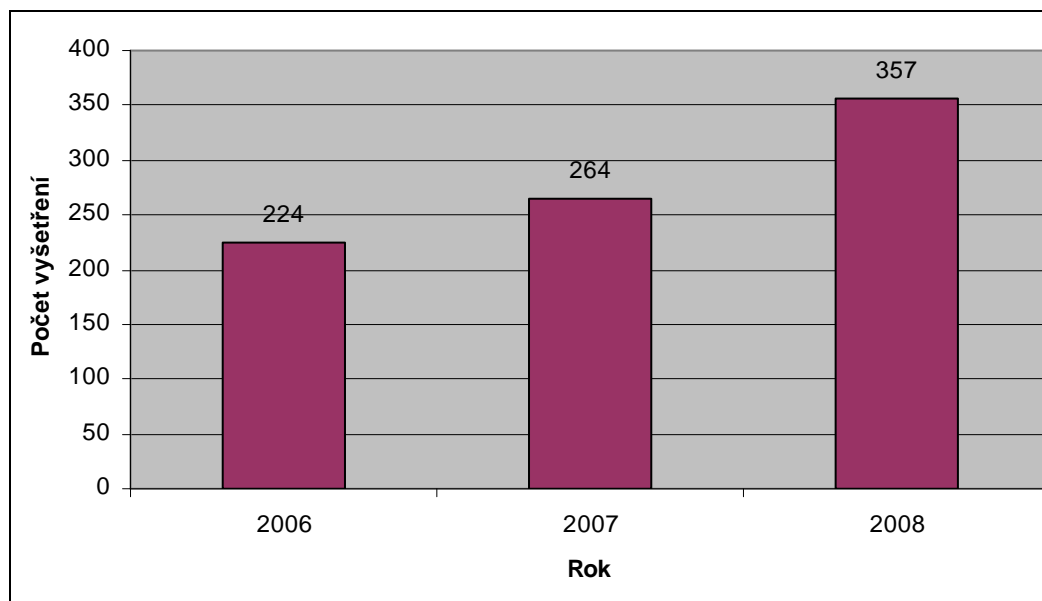
Ke kontrole a řízení jakosti používáme kontrolní materiál na bázi lidského séra s určenými koncentracemi pro uvedený princip metody:

- **TMC Tumor Marker Controls** označené jako **TMCO**. Tato kontrola se používá ve třech hladinách: level 1 (nízká), level 2 (střední), level 3 (vysoká). Například TMCO level 1 má u šarže 028 hodnotu koncentrace CA125 27,0 IU/ml, level 2 má u šarže 028 hodnotu koncentrace CA125 44,0 IU/ml, level 3 má u šarže 028 hodnotu koncentrace CA125 90 IU/ml. Kontrolní séra jsou dodávána v lyofilizované formě (1 balení obsahuje 6 ks lahviček á 5 ml o 3 různých hladinách koncentrací analytu), před použitím je nutné provést rekonstituování (viz kapitola 5.1.1).

Součástí kontroly a řízení jakosti je pravidelná účast na mezilaboratorních kontrolách kvality organizovaných ve vhodných intervalech například firmou SEKK.

Statistika vyšetření CA125 v laboratoři AXIS

Statistika vyšetření CA 125 v Hematologické a biochemické laboratoři AXIS-CZ Hradec Králové, s.r.o. v letech 2006 až 2008 dokládá i narůstající význam těchto vyšetření stejně jako v předchozích případech. Za poslední tři roky stoupl počet vyšetření CA125 o 59,4% (obr. č. 30).

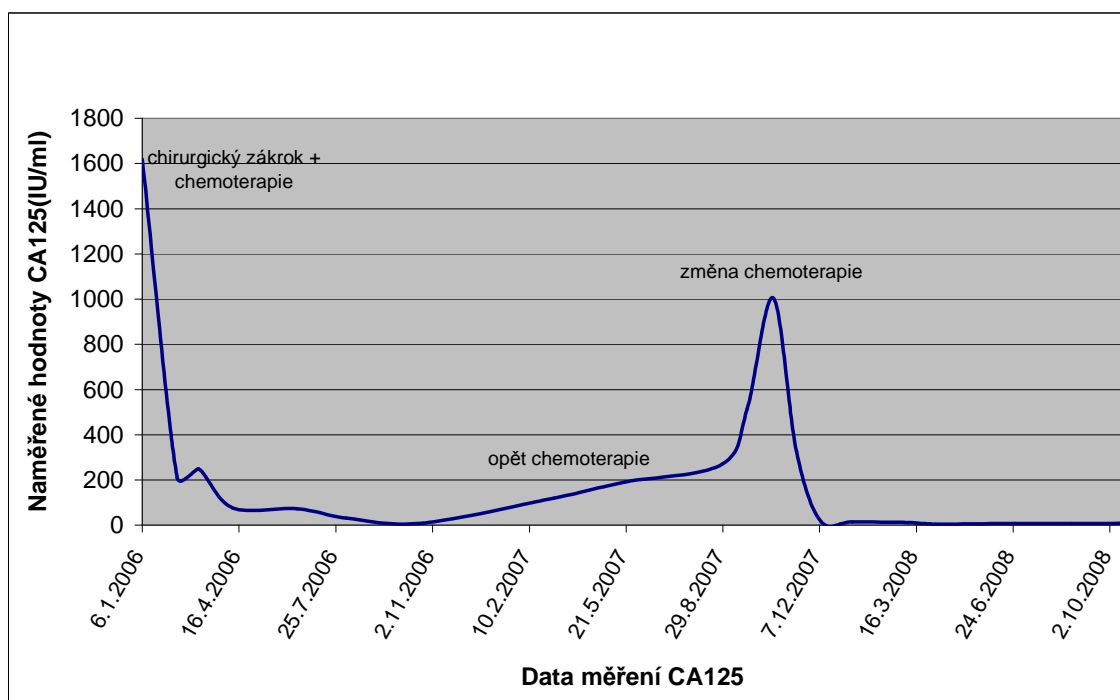


Obr. č. 30: Statistika vyšetření CA125 v letech 2006 - 2008

Příklad č. 3

Vybraná kazuistika z databáze laboratoře AXIS-CZ - sledování průběhu onemocnění a efektu léčby u karcinomu ovarií :

Pacientka, žena, 61let, sledována v laboratoři AXIS-CZ v souvislosti s diagnózou karcinomu ovarií, 1/2006 proveden chirurgický zákrok, léčena adjuvanční chemoterapií do 10/2007, pokles CA125. 6/2007 vzestup CA125, CT vyšetření bez patologických nálezů, opět nasazena chemoterapie s přechodným poklesem CA125. Od 8/2007 opět vzestup CA125, proto změna chemoterapie. Od počátku r. 2008 pokles CA125 do fyziologických hodnot, monitorovaná i nadále (obr. č. 31).



Obr. č. 31: Kazuistika CA125

5.3 Nespecifické antigeny a tumorové markery

5.3.1 Stanovení koncentrace ferritinu v séru imunochemicky (CLIA) na analyzátoru Immulite 2000

Teorie, použití, preanalytické požadavky

Podrobně popsáno v kapitole 3.3.1 v teoretické části diplomové práce.

Princip

Stanovení je založeno na reakci jednoho epitopu ferritinu s monoklonální myší protilátkou navázanou na polystyrenové kuličce a druhého epitopu s polyklonální kozí protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou v reagenčním pufovaném roztoku. Reakce probíhá 30 minut při 37°C.

Nenavázaný materiál se odstraní odstředivým promýváním. Přidá se substrát fosforečný ester adamantyl dioxetanu, který hydrolyzuje stykem s alkalickou fosfatázou za vzniku nestabilního meziprojektu. Ten se ihned rozpadá za produkce záření, které se detekuje luminometrem. Intenzita vzniklého záření je přímo úměrná koncentraci ferritinu ve vyšetřovaném vzorku.

Inkubační cykly: 1 x 30 minut

Potřebný objem vzorku: 10 µl (+ mrtvý objem 150 µl) séra

Odběr primárního vzorku a transport

Stanovení se provádí v nehemolytickém séru. Speciální příprava pacienta ani dieta není nutná, pro obvyklé vyšetřování je vhodný odběr ráno, nalačno. Odběr se provádí ze žíly, za použití zkumavky pro biochemický odběr, bezprostředně po odběru je nutno vzorek odstředit.

Znaky analytické metody

- Analytická proveditelnost: Časová dostupnost výsledku - výsledky jsou k dispozici 3 hodiny od přijetí materiálu, statimové vyšetření do 1 hodiny.
- Linearita: Test je lineární v rozmezí hodnot 0 -1500 µg/l.
- Přesnost: Při zavádění metodiky v laboratoři AXIS byly vzorky opakovaně stanovovány duplicitně v průběhu 20ti dní, celkem 40 cyklů a 80 replikátů (tab. č. 9).

Tab. č. 9: Stanovení přesnosti metodiky pro stanovení ferritinu v laboratoři AXIS

Střední hodnota	V sérii		Celkem	
	SD	CV%	SD	CV%
13,0	0,44	3,4	0,76	5,9
158,0	4,7	3,0	6,3	4,0
323,0	11,0	3,4	18,0	5,6
531,0	21,0	4,0	28,0	5,3
1081,0	57,0	5,3	78,0	7,2

Pro účely této diplomové práce jsem stanovovala ferritin ve vzorku zdravé pacientky, opakovaně 14krát v průběhu 1 dne pro ověření reprodukovatelnosti (tab. č. 10).

Tab. .č. 10: Ověření reprodukovatelnosti metodiky pro stanovení ferritinu v laboratoři AXIS

Číslo měření	Hodnota ferritinu (ug/L)
1	14,0
2	13,0
3	12,4
4	12,6
5	14,1
6	12,9
7	13,0
8	13,2
9	12,0
10	12,3
11	12,2
12	13,1
13	12,3
14	13,4
Průměrná hodnota	12,893
Směrodatná odchylka	0,645
Variační koeficient (%)	5,003

- Citlivost: 0,4 µg/l
- Limitace - interference: následující sledované interferující látky nezpůsobují v metodě významnou interferenci
 - Bilirubin: přítomnost bilirubinu v koncentracích do 342 µmol/l nemá v rámci přesnosti stanovení žádný vliv na výsledky.
 - Hemolýza: přítomnost červených krvinek oddělených od plazmy v koncentracích do 30 µl/ml nemá v rámci přesnosti stanovení žádný vliv na výsledky.
 - Lipémie: přítomnost triglyceridů v koncentracích do 56,5 mmol/l nemá v rámci přesnosti stanovení žádný vliv na výsledky.
- Toleranční rozpětí chyb při mezilaboratorních kontrolních cyklech organizovaných firmou SEKK bylo v letech 2007 - 2009 22%.

Referenční a varovná rozmezí

Výrobce udává referenční fyziologické rozmezí, s tím, že výsledek závisí na věku, pohlaví, dietě a geografické poloze. Je proto vhodné, aby si každá laboratoř určila vlastní referenční rozmezí pro svou vlastní populaci.

Referenční rozmezí daná Hematologickou a biochemickou laboratoří AXIS-CZ Hradec Králové, s.r.o.: muži : 28 - 365 µg/l

ženy : 5 - 148 µg/l

Přístroje a pomůcky

Viz kapitola 5.1.1

Reagencie

Skladování reagensů probíhá při teplotě 2 – 8°C, likvidace musí probíhat v souladu s platnými předpisy.

Balení soupravy pro stanovení ferritinu L2KFE2 (je složeno z jednotlivých komponent, ty představují ucelenou sadu). Pro stanovení jsou zapotřebí štítky s čárovými kódy.

Souprava L2KFE2 obsahuje:

- **Ferritin zásobník s kuličkami (L2FE12)** - zásobník je opatřen čárovým kódem, obsahuje 200 kuliček potažených monoklonální myší protilátkou proti ferritinu. Protilátka je stabilní při 2 – 8°C do expirace.
- **Ferritin reagencie (L2FEA2)** - reagencie je opatřena čárovým kódem, obsahuje 11,5 ml alkalické fosfatázy (z telecího střeva) konjugované s polyklonální kozí protilátkou proti ferritinu v pufru, s konzervačním prostředkem. Reagenci je stabilní při teplotě 2 – 8°C do expirace. Před použitím je nutno utrhnout vršek štítku v perforovaném místě, ale nesmí se poškodit čárový kód. Z vrchu nádoby se odstraní uzavírací fólie, posuvný uzávěr se zaklapne do ramp na víčku reagencie.
- **Ferritin adjustory (LFEL, LFEH)** - dvě ampulky každá o obsahu 2,5 ml s nízkou (označena A) a vysokou (označena B) koncentrací FER v lidském séru/ pufovaném matrixu. Stabilní 30 dnů po otevření

při teplotě 2 – 8°C nebo rozdělené na alikvotní části 6 měsíců při minus 20°C.

Materiál dodávaný zvlášť:

- **L2SUBM:** Chemiluminiscenční substrát (Chemiluminiscent substrate)
- **L2PWSM:** Promývací roztok (Probe cleaning kit)

Spotřební materiál; příprava k činnosti; stručný popis pracovního postupu; adjustace

Viz kapitola 5.1.1

Dokumentace, zpracování dat a vydávání výsledků

Analyzátor hodnotí koncentraci ferritinu ve vzorku podle platné adjustace. Výsledky se vydávají v µg/l. Dále viz kapitola 5.1.1.

Interpretace výsledků, konzultační činnosti a hlášení

Patologické zvýšení ferritinu nad 400 µg/l bývá velice často u těchto nádorových onemocnění: Hodgkinova choroba, maligní melanom, kolorektální karcinom, rakovina prsu. Asi u 35% pacientů s testikulárními tumory, karcinomem prostaty, jater, akutní leukémií, s mnohočetným myelomem a neuroblastomem. Ferritin lze považovat za pozitivní reaktant akutní fáze s maximem zvýšení v séru 8. – 10. den, takže se může nespecificky zvyšovat u akutních virových hepatitid, ale i u jiných zánětlivých onemocněních. Do cirkulace se uvolňuje z rozpadu hepatocytů při jejich nekróze. Po ústupu akutního zánětu se hladina ferritinu ustálí pod 400 µg/l. Při maligních onemocněních přetrvává trvale zvýšená hodnota.

Stanovení koncentrace ferritinu v séru je důležité při diagnose nadbytku nebo nedostatku železa, při diferenciaci mezi anémií z nedostatku železa a anémií z jiných příčin, při sledování progresivní eroze zásob železa v těhotenství, u pacientů podstupujících pravidelnou dialýzu, při screeningu precirhotické hemochromatózy, při monitorování pacientů pravidelně léčených transfuzí atd.

Řízení jakosti

Kontrolu kvality pomocí kontrolních referenčních materiálů je zapotřebí provádět minimálně 1x za směnu a dále například vždy po adjustaci, po servisním zásahu spojeném s výměnou významné součásti analyzátoru, při jakékoliv pochybnosti o správnosti analýzy vzorků, atd.

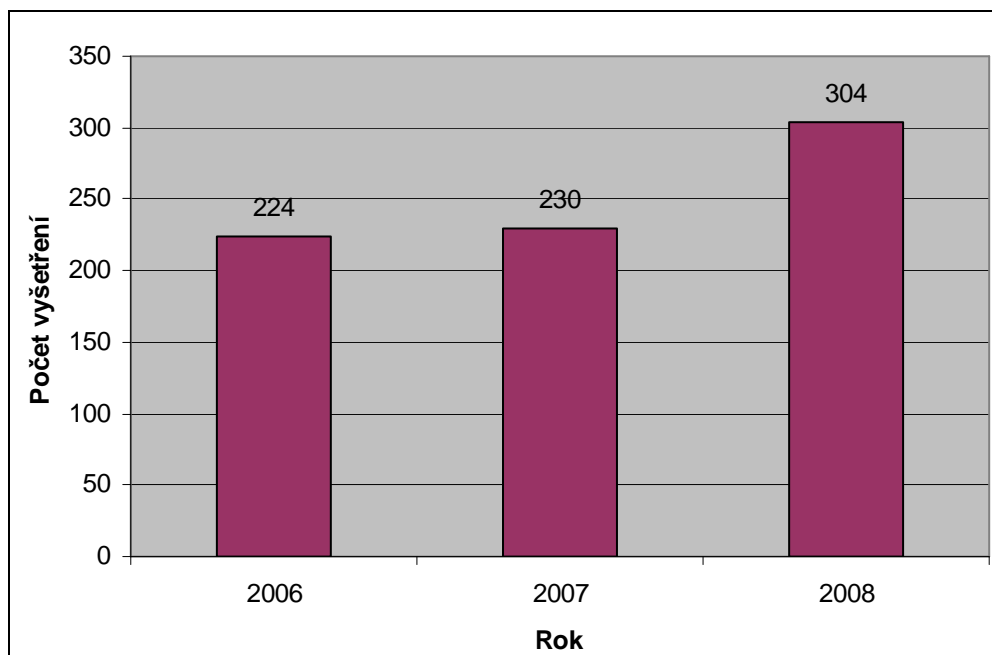
Ke kontrole a řízení jakosti používáme kontrolní materiál na bázi lidského séra s určenými koncentracemi pro uvedený princip metody:

- **Ferritine Controls** označené jako **FECM**. Tato kontrola se používá ve dvou hladinách: level 1 (nízká), level 2 (vysoká). Například **FECM** level 1 má u šarže 0102 hodnotu koncentrace FER 36 µg/l, level 2 má u šarže 0102 hodnotu koncentrace FER 175 µg/l. Kontrolní séra jsou dodávána v lyofilizované formě (1 balení obsahuje 6 ks lahviček á 5 ml o 3 různých hladinách koncentrací analytu), před použitím je nutné provést rekonstituování (viz kapitola 5.1.1).

Součástí kontroly a řízení jakosti je pravidelná účast na mezilaboratorních kontrolách kvality organizovaných ve vhodných intervalech například firmou SEKK .

Statistika vyšetření ferritinu v laboratoři AXIS

Ze statistiky vyšetření ferritinu v Hematologické a biochemické laboratoři AXIS-CZ Hradec Králové, s.r.o. v letech 2006 až 2008, že za poslední tři roky stoupl počet vyšetření ferritinu o 35,7%. Vyšetření ferritinu v laboratoři AXIS často ale souvisí i s jinými onemocněními než jsou onemocnění nádorová (např. onemocnění GIT) (obr. č. 32).



Obr. č. 32: Statistika vyšetření ferritinu v letech 2006 - 2008

Příklad kazuistiky spojené s monitorováním hladiny ferritinu u nádorového onemocnění se bohužel v databázi laboratoře AXIS nevyskytl. Laboratoř AXIS často vyšetřuje ferritin v souvislosti s onemocněními GIT u pacientů z poradny gastroenterologie.

5.3.2 Kvantitativní stanovení aktivity LD v séru kinetickým UV fotometrickým testem soupravou LD (IFCC/GSCC 94) OSR 6128 OLYMPUS DIAGNOSTICA na analyzátoru OLYMPUS AU 400

Teorie, použití, preanalytické požadavky

Viz kapitola 3.3.3 v teoretické části diplomové práce.

Princip

Laktátdehydrogenáza (LD) katalyzuje oxidaci L-laktátu na pyruvát při současně redukci nikotinamidadenindinukleotidu (NAD^+) na NADH. Nárůst NADH

sledovaný fotometricky při 340 nm je přímo úměrný katalytické koncentraci laktátdehydrogenázy.



Kinetický fotometrický UV test je založen na doporučení IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) a GSCC (German Society for Clinical Chemistry) z roku 1994.

Odběr primárního vzorku a transport

Pro stanovení v séru je možné použít pouze srážlivou krev. Při odběru se musí zabránit hemolýze vzorku, protože erythrocyty obsahují 150x více LD než sérum. Stanovení ovlivňuje fyzická aktivita, přílišné zatažení paže při odběru, trombocytóza a těhotenství. Sérum je vždy nutné, cca po 50ti minutách srážení, oddělit. Plazmu nelze pro stanovení použít, protože může být kontaminována částicemi s vysokou koncentrací LD.

Vzorek po odběru a při transportu nemrazit. Při uchovávání v lednici při 2 - 8°C dochází k poklesu aktivity LD již po 4 dnech, zatímco při teplotě 15 - 25°C je vzorek stabilní až po dobu 7 dní.

Znaky analytické metody

- **Analytická proveditelnost:** Časová dostupnost výsledku - výsledky jsou k dispozici 3 hodiny od přijetí materiálu, statimové vyšetření do 2 hodin.
- **Linearita:** 0,4 – 20 $\mu\text{kat/l}$
- **Analytická přesnost:** Při zavádění metodiky v laboratoři AXIS bylo měřeno 60 vzorků (tab. č. 11).

Tab. č. 11: Stanovení přesnosti metodiky pro stanovení LD v laboratoři AXIS

Sérum	Opakovatelnost (v sérii)			Reprodukovatelnost (v čase 10 dnů)		
	Průměr ($\mu\text{kat/l}$)	SD ($\mu\text{kat/l}$)	VK (%)	Průměr ($\mu\text{kat/l}$)	SD ($\mu\text{kat/l}$)	VK (%)
Nízká aktivita	2,61	0,030	1,13	2,63	0,040	1,54
Střední aktivita	3,93	0,035	0,89	3,97	0,054	1,36
Vysoká aktivita	7,14	0,054	0,76	7,16	0,102	1,43

Pro účely této diplomové práce jsem stanovovala LD ve vzorku zdravého pacienta, opakovaně 13krát v průběhu 1 dne pro ověření reprodukovatelnosti (tab. č. 12).

Tab. č. 12: Ověření reprodukovatelnosti metodiky pro stanovení LD v laboratoři AXIS

Číslo měření	Hodnota LD ($\mu\text{kat/l}$)
1	2,80
2	2,72
3	2,78
4	2,73
5	2,72
6	2,76
7	2,76
8	2,73
9	2,79
10	2,77
11	2,75
12	2,75
13	2,72
Průměrná hodnota	2,752
Směrodatná odchylka	0,027
Variační koeficient (%)	0,997

➤ Limitace - interference:

- hemolytický vzorek – nelze pro stanovení vůbec používat – v erythrocytech se nachází 150x víc LD než v séru
- přídavek bilirubinu 684 $\mu\text{mol/l}$ způsobil zvýšení katalytické

koncentrace LD jen o méně než 3%.

- přídavek 0,7 g/l Intralipid® způsobil změnu katalytické koncentrace LD jen o méně než 5%.
- Toleranční rozpětí chyb při mezilaboratorních kontrolních cyklech organizovaných firmou SEKK bylo v letech 2006 - 2008 21%.

Referenční a varovná rozmezí

Fyziologické hodnoty ale závisí na věku, pohlaví, typu vzorku a geografické poloze.

Referenční rozmezí daná Hematologickou a biochemickou laboratoří AXIS-CZ

Hradec Králové, s.r.o.: 0-6m+20d	3,75 - 10,0 μ kat/l
6m+21d-2 roky	3,0 - 7,2 μ kat/l
2r+1d-15r	2,0 - 5,0 μ kat/l
Ženy:15r+1d-100r	2,25 - 3,55 μ kat/l
Muži:15r+1d-100r	2,25 - 3,75 μ kat/l

Přístroje a pomůcky

Biochemický fotometrický analyzátor Olympus AU 400 (obr. č. 33), laboratorní odstředivka, automatické pipety



Obr. č. 33: Biochemický analyzátor Olympus AU 400

Reagencie

Set na stanovení LD OSR 6128 obsahuje: R1 (čirá bezbarvá kapalina) 4 x 40 ml; R2 (čirá bezbarvá kapalina) 4 x 20 ml. Reagencie jsou připraveny k přímému použití. Reagencie dodávané v jednom balení setu postačují pro provedení 2000 stanovení na analyzátoru Olympus AU 400.

Neotevřené reagencie jsou při skladování v lednici (2 - 8°C) stabilní do doby expirace vyznačené na obalu. V chlazeném prostoru analyzátoru (on board) jsou reagencie stabilní po dobu 30 dnů.

Reagencie obsahují:

- D(-)N-Methylglucamin pufr (pH 9,4) - 325 mmol/l
- NAD⁺ - 10 mmol/l
- Laktát - 50 mmol/l
- Azid sodný (konzervační činidlo)

Spotřební materiál

Viz kapitola 5.1.1.

Příprava k činnosti

Zpravidla 1x za směnu musí obsluha zkontrolovat zásobu a stav reagentů v reagenčním kruhu analyzátoru a nejméně jednou za směnu (nejlépe s každou měřenou sérií vzorků) provést kontrolu jakosti pomocí kontrolních materiálů. V případě, že výsledky kontrol neodpovídají nastavenému tolerančnímu rozmezí musí se provést nová kalibrace, eventuálně nalézt a odstranit případná závada a následně zopakovat měření kontroly jakosti.

V pravidelných intervalech se také musí provést předepsaná údržba analyzátoru dle manuálu k analyzátoru Olympus AU 400.

Stručný popis pracovního postupu

Pracovní činidla R1 a R2 se vloží do reagenčního kruhu analyzátoru.

Automatický analyzátor dále pracuje sám dle aplikace pro stanovení LD:

➤ Pipetované objemy:

R1:	80 µl	Diluent:	0 µl
R2:	40 µl	Diluent:	40 µl
Sérum:	3 µl	Diluent:	0 µl

- Vlnová délka: hlavní 340 nm vedlejší 380 nm
➤ Metoda: RATE - kinetika

Obsluha analyzátoru umísťuje rutinní analyzované vzorky séra v kepech HITACHI v naplánovaném pořadí do vzorkových šedých stojánek a ty do podavače analyzátoru. Pokud je analyzátor ve stavu STANDBY, stiskne se ikona START a tím se zahájí analýza, která dále probíhá automaticky. Požadavky na analýzy se do analyzátoru mohou přenášet počítačovou sítí prostřednictvím laboratorního informačního systému, nebo se zadávají ručně pomocí klávesnice řídicího počítače analyzátoru.

Výsledky se z analyzátoru automaticky přenášejí zpět do laboratorního informačního systému. Po analytické a lékařské kontrole jsou vydány požadujícímu pracovišti.

Kalibrace

Pro kalibraci se používá **Olympus System Calibrator** katalogové číslo OE 66300 (balení obsahuje 20 x 5 ml). Například v současnosti používaná šarže 111 má nastavenou hodnotu LD na 2,27 µkat/l. Pro každou sérii měření je nutné použít čerstvě rozpuštěnou lahvičku kalibrátoru, protože rekonstituovaný kalibrátor je pro stanovení LD stabilní pouze po dobu 8 hodin.

Hodnoty kalibrátoru jsou navázány na referenční metodu IFCC a referenční materiál IRMM/IFCC-453.

Přesný postup kalibrace je uveden v návodu k obsluze analyzátorů Olympus.

Bezprostředně po kalibraci by měla v souladu se zásadami správně laboratorní praxe následovat kontrola kvality.

Kalibrátory se většinou dodávají v lyofilizovaném stavu. Doporučuje se skladovat je v lednici při 2 - 8°C, v tom případě jsou kalibrátory stabilní až do doby expirace vyznačené na každé lahvičce.

Doporučený postup rekonstituování lyofilizovaného kalibrátoru viz kapitola 5.1.1.

Rekalibraci je třeba provést vždy při změně šarže reagentie, po doplnění reagentie, při významné změně výsledků kontrolních materiálů, po velké údržbě analyzátoru a po výměně důležité součásti analyzátoru

Laboratoř si musí určit vlastní frekvenci provádění kalibrací.

Typ kalibrace: lineární

Stabilita kalibrace: cca 30 dní

Dokumentace, zpracování dat a vydávání výsledků

Automatický fotometrický analyzátor vyhodnotí naměřenou absorbanci vzorku podle platné kalibrace.

Výsledek se průběžně zobrazuje na monitoru řídicího počítače analyzátoru a současně se automaticky přenáší do laboratorního informačního systému LIS MIKYSKA. Mimo to je možný průběžný tisk výsledků na připojené tiskárně. Následuje analytická a lékařská kontrola výsledků a jejich výdej na příslušná pracoviště.

Jestliže při měření dojde například k překročení kalibračního limitu, k atypickému průběhu reakce nebo k nějaké závažné chybě při analýze, objeví se na monitoru vedle výsledku příslušná značka (podrobnosti viz manuál analyzátoru Olympus AU 400).

Analyzátor je nastaven tak, že při překročení rozsahu linearit dané výrobcem (0,4 - 20,0 $\mu\text{kat/l}$) se analýza automaticky zopakuje s vhodným ředěním vzorku.

Výsledky se vydávají v $\mu\text{kat/l}$ na dvě desetinná místa. Předávají se (po splnění všech požadavků na stanovení a po analytické a lékařské kontrole) na analýzu

požadující pracoviště buď v elektronické formě pomocí počítačové sítě, nebo po tisku v papírové formě spolu s vyznačením fyziologických hodnot případně s hvězdičkovým vyznačením jejich překročení.

Všechny výsledky se archivují v elektronické formě v laboratorním informačním systému a mimo to ještě v papírové formě v jednou denně vytištěné hlavní knize laboratoře viz LP.

Interpretace výsledků

LD se vyskytuje ve všech buňkách těla. Stanovení aktivity celkové LD proto není příliš specifické pro určité onemocnění. Hlavními diagnostickými aplikacemi jsou stavy spojené s poškozením tkání a rozpadem buněk:

- Krevní onemocnění (hemolytická anémie, myeloidní leukémie, infekční mononukleóza)
- Poškození svalů (progresivní svalová dystrofie, trauma, operace)
- Poškození myokardu (infarkt myokardu, myokarditida, paroxysmální tachykardie, kardiální dysrytmie). Zvýšení obvykle 3 - 4x.
- Jaterní onemocnění (akutní selhání jater, akutní virová hepatitida, cirhóza, toxické poškození jater, infekční mononukleóza). Zvýšení až 10x.
- Karcinomy (metastázy do jater, lymfomy, leukémie)

Ostatní (akutní selhání ledvin, intoxikace organickými rozpouštědly, pneumonie, Korejská hemoragická horečka, chronické onemocnění glomerulů, šok, pulmonární embolie, hemolytická a megaloblastická anémie, dermatomyositis, polymyositis, aj.)

Řízení jakosti

Každá laboratoř by si měla určit vlastní frekvenci a způsob provádění kontrolní činnosti. Nicméně ze zásad správné laboratorní praxe vyplývá, že kontrolní materiály by se měly analyzovat minimálně 1x za směnu a potom vždy po recalibraci metody, po významném servisním zásahu jako je například výměna některé podstatné součástky analyzátoru a dále samozřejmě po přechodu na jinou šarži setu. Ke kontrole a řízení jakosti lze použít všechny komerčně dostupné kontrolní materiály na bázi lidského séra s určenými

aktivitami LD pro daný princip stanovení.

Precinorm U má u šarže 16796901 katalytickou koncentraci LD 2,67 μ kat/l.

Kontrolní séra jsou dodávána v lyofilizované formě (1 balení obsahuje 20ks lahviček á 5 ml), takže před použitím je nutné provést rekonstituování.

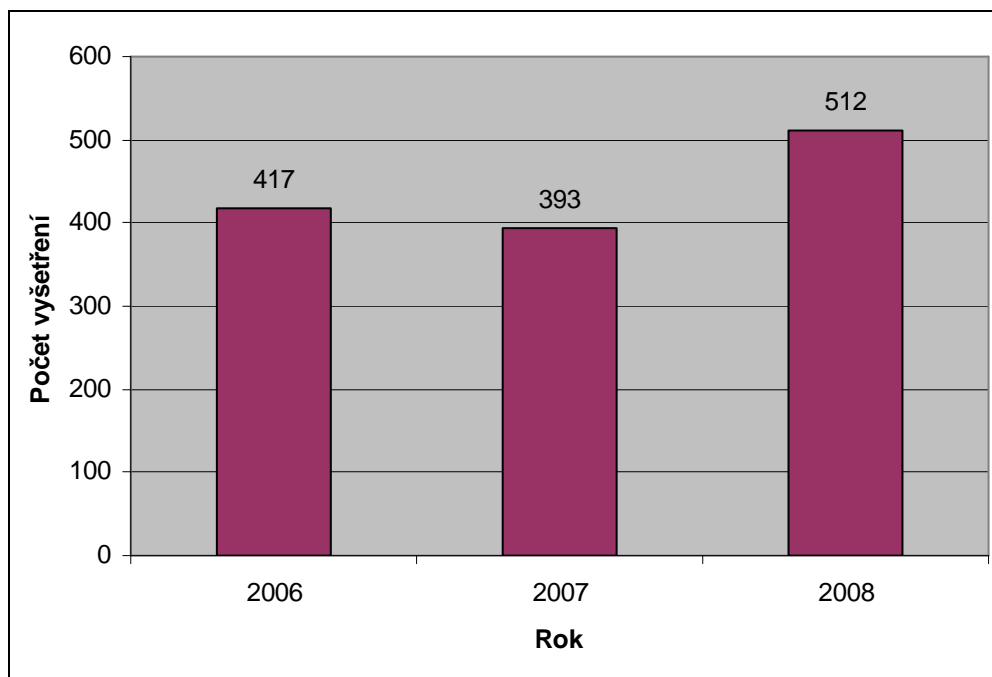
Doporučený postup rekonstituování lyofilizovaného materiálu viz kapitola 5.1.1. Lyofilizovaná kontrolní séra se uchovávají v lednici při 2 - 8°C. V tom případě jsou stabilní až do doby expirace vyznačené na každé lahvičce. Rekonstituovaná (a eventuálně rozpipetovaná) uzavřená kontrolní séra jsou pro stanovení aktivity LD stabilní 7 dní při uchovávání v mrazničce (při minus 18 až minus 20°C).

Výsledky získávané při analýzách kontrolních materiálů se průběžně zaznamenávají do kontrolních regulačních diagramů. V regulačních diagramech jsou mimo průměrných hodnot kontrolního materiálu vyznačeny i varovné (průměr \pm 2 x směrodatná odchylka) a regulační (průměr \pm 3 x směrodatná odchylka) meze. Případné překročení těchto mezí znamená, že se analýza musí pozastavit, metodu a postup stanovení je nutné prověřit a po odstranění zjištěné závady analýzu zopakovat.

Součástí kontroly a řízení jakosti by měla být pravidelná účast na mezilaboratorních kontrolách kvality organizovaných ve vhodných intervalech například firmou SEKK.

Statistika vyšetření LD v laboratoři AXIS

Ze statistiky vyšetření LD v Hematologické a biochemické laboratoři AXIS-CZ Hradec Králové, s.r.o. v letech 2006 až 2008 vyplývá, že počet vyšetření LD se také zvýšil, tato vyšetření ale nelze dát jen do souvislosti s nádorovými onemocněními. Často je vyšetření LD prováděno v souvislosti s jinou diagnózou (obr. č. 34). Z tohoto důvodu neuvádím ani příklad kazuistiky.



Obr. č. 34: Statistika vyšetření LD v letech 2006 - 2008

6. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo podat stručný přehled o nejčastěji vyšetřovaných nádorových markerech, jejich orgánové specificitě a metodách stanovení. Experimentální část jsem věnovala stanovení vybraných markerů imunochemicky metodou chemiluminiscence na automatickém analyzátoru Immulite v laboratoři AXIS-CZ v Hradci Králové.

Ze skupiny onkofetálních antigenů jsem stanovovala koncentraci AFP v séru (VK 4,383%). Ze skupiny tkáňově či orgánově specifických antigenů jsem se zaměřila na stanovení koncentrace celkového PSA v séru (VK 6,052%) a koncentrace CA125 v séru (VK 3,886%). Ze skupiny nespecifických antigenů a tumorových markerů jsem si zvolila stanovení koncentrace ferritinu v séru (VK 5,003%) a stanovení aktivity LD v séru (VK 0,997%). Stanovení LD jako jediné z výše uvedených bylo prováděno na biochemickém analyzátoru Olympus kinetickým UV fotometrickým testem. Nízké hodnoty variačních koeficientů (VK) u všech stanovovaných nádorových markerů potvrzují vysokou analytickou kvalitu použitých metod.

K výše uvedeným nádorovým markerům dokládám i statistiky počtu vyšetření v laboratoři AXIS-CZ za poslední tři roky. Se vzrůstajícím počtem vyšetření souvisí pravděpodobně stále větší výskyt nádorových onemocnění, k němuž přispívá stárnutí populace, současný životní styl (stravovací návyky, kouření, nedostatek fyzické aktivity, nadváha, stres a jiné, zatím neznámé faktory životního prostředí), ale i narůstající význam těchto vyšetření hlavně v oblasti monitorování léčby, sledování remise, případně relapsu onemocnění.

Ve své diplomové práci uvádím i kazuistiky třech pacientů s nádorovým onemocněním z databáze laboratoře AXIS-CZ. V prvním případě se jednalo o pacienta, muže (52 let), s diagnózou karcinomu varlete, jehož předoperační hodnoty AFP byly více než 10krát vyšší oproti normálu. Po chirurgickém zákroku a další terapii se cca po 6ti měsících vrátily k fyziologickým hodnotám. Pacient nadále zůstává pod dohledem a již téměř dva roky se hodnoty pravidelně měřeného AFP pohybují ve fyziologickém rozmezí. Ve druhém případě jsem vybrala pacienta, muže (59 let), s diagnózou karcinomu prostaty. Předoperační hodnoty PSA dosahovaly 5ti násobku horní hranice fyziologického rozmezí, po chirurgickém zákroku se během jednoho měsíce

vrátily k normálu. Pacient je dále pravidelně sledován. Hodnoty PSA se pohybují i nadále ve fyziologických mezích. V poslední kazuistice sleduji pacientku, ženu (61 let), s diagnózou karcinomu ovárií. Předoperační hodnoty CA125 dosahovaly až 80ti násobku normálu. Po chirurgickém zákroku a chemoterapii poklesly během tří měsíců k fyziologickým hodnotám. V krátké době však došlo k opětovnému vzestupu CA125, po následné změně chemoterapie se hladina CA125 normalizovala a dle výsledků posledních odběrů je pravděpodobná remise onemocnění.

Nádorová onemocnění jsou vzrůstající příčinou morbidity a mortality ve vyspělých zemích na celém světě. Proto jsou nádorové markery v současné době středem pozornosti při diagnostice, ale hlavně při léčbě a dlouhodobém sledování nemocných s maligním onemocněním.

Každé desetiletí a v poslední době každým rokem přibývá několik nových „slibných“ nádorových markerů, tak jako přibývají naše znalosti o mechanismech nádorového bujení. Ideální nádorový marker by měl splňovat tato kritéria: být produkován pouze u maligních onemocnění, být orgánově specifický, vyskytovat se ve vyšších koncentracích v biologických tekutinách, jeho hladina by měla korelovat s velikostí nádoru, se stadiem onemocnění, s prognózou a efektem léčby a umožnit průkaz zbytkové nádorové tkáně. Marker splňující veškeré výše uvedené požadavky v současné době neexistuje. Užívané markery však splňují alespoň některé z těchto kritérií. Optimální interpretace výsledků vyžaduje znalost jak metodických problémů, tak i znalost průběhu onemocnění u konkrétního nemocného.

Významnou indikací k vyšetření solubilních nádorových markerů je sledování účinku terapie nádorových onemocnění. Vzhledem k různým biologickým poločasům jednotlivých markerů je nutno správně volit intervaly odběrů krve k vyšetření tak, aby se skutečně postihl efekt terapie, nikoli pouze tzv. lysis fenomén, tj. prudké zvýšení koncentrace markeru jako důsledek cytolyzy po bezprostředním působení protinádorové terapie [72]. Pro frekvenci vyšetřování platí kritéria doporučená WHO a podle zkušeností kliniků i statistiků hodnotících dynamiku změn nádorových markerů ve vztahu ke klinickému průběhu choroby je třeba dodržovat doporučenou frekvenci vyšetření. Jedná se totiž o vyšetření pacienta prakticky nezatěžující.

Nádorové markery umožňují v moderní medicíně zcela nové přístupy v léčbě onkologicky nemocných. Mohou přispět k rozlišení mezi benigním a maligním nádorem, k určení stadia onemocnění a především jsou vhodné pro včasný záchyt recidivy onemocnění. Proto indikované použití vhodného markeru může rozhodujícím způsobem přispět k výsledku léčby a tím zlepšit dobu přežití nemocného.

7. SEZNAM ZKRATEK

AFP	alfa-fetoprotein
AIM	akutní infarkt myokardu
BGP	biliární glykoprotein
BPH	benigní prostatická hypertrofie
Ca	karcinom
CEA	karcinoembryonální antigen
CGM-2	CEA-Gene Family Member 2
CLIA	chemiluminiscenční analýza
CNS	centrální nervový systém
CT	Computed Tomography (počítačová tomografie)
CV (VK)	Coefficient of Variation (variační koeficient)
CYFRA 21-1	fragment cytokeratinu 19
ČLS JEP	Česká lékařská společnost J. E. Purkyně
EIA	enzymoimunoanalýza
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EU	Evropská unie
FECM	Ferritine Controls
FER	ferritin
FIA	fluoroimunoanalýza
fPSA	free PSA
FSH	folitropin
GIT	gastrointestinální trakt
HAMA	heterofilní lidské anti-myší protilátky
hCG	Human (lidský) choriogonadotropin
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPV	Human (lidský) papillomavirus
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory
IPI	International Prognostic Index
IRMA	imunoradiometrická analýza
IRMM	Institute for Reference Materials and Measurements

LD	laktátdehydrogenáza
LH	lutropin
LIS	laboratorní informační systém
M. Gaucher	Morbus Gaucher
M. Hodgkin	Morbus Hodgkin
NAD ⁺ , NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NCA	nespecifický cross-reaktivní antigen
NSE	neuron-specifická enoláza
PLAP	placentární alkalická fosfatáza
PSA	prostatický specifický antigen
RIA	radioimunoanalýza
SCC, SCCA	antigen squamózních buněk
SCLC	malobuněčný karcinom plic
SD	Standard Deviation (směrodatná odchylka)
SEKK	systém externí kontroly kvality
TAG 72	mucinový komplex
TMC, TMCO	Tumor Markers Control
TPA	tkáňový polypeptidový antigen
TPS	tkáňový polypeptidový specifický antigen
TSH	thyreotropin
WHO	World Health Organisation
β ₂ M	beta2-mikroglobulin

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] <<http://ucebnice.euromise.cz/index.php?conn=0§ion=epidem&node=node153>> [cit. 2006-11-27]

[2] <http://www.mou.cz/mou/section_show.jsp?s=901%7C905%7C927&selldoc=112> [cit. 2006-11-27]

[3] <<http://www.osel.cz/index.php?clanek=1610>> [cit. 2006-12-01]

[4] KOCUR I.: Zprávy z WHO - Ke Světovému dni boje proti rakovině, *Zdravotnické noviny - Lékařské listy* 9, 2004, 4 – 7.

[5] NEKULOVÁ M., Kdy a proč vyšetřovat nádorové markery, *Sborník Biolab 2006*, 28 – 29.

[6] <<http://www.uzis.cz>> [cit. 2009-21-05]

[7] <<http://www.svod.cz>> [cit. 2006-12-07]

[8] DUŠEK L. A KOL.: Péče o české onkologické pacienty v číslech, *Zdravotnické noviny - Lékařské listy* 3, 2009, 4 – 8.

[9] SCHNEIDERKA P. A KOL.: *Kapitoly z klinické biochemie*, Karolinum, Praha 2004, ISBN 80-246-0678-x, 234 – 264.

[10] <http://sz.ordinace.cz/lekce_uvod.php?lekce=8> [cit. 2006-11-27]

[11] <<http://www.nemstbk.cz/olm/soubsys/onkomark.htm>> [cit.2006-06-02]

[12] HEGYI P., WILHELM Z.: Onemocnění žaludku, *Praktické lékárenství* 3, 2006, 152 – 154.

[13] ŽALOUDÍK J.: Karcinom žaludku, Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Doporučené postupy pro praktické lékaře, Projekt MZ ČR zpracovaný ČLS JEP za podpory grantu IGA MZ ČR 5390-3, Reg. č. a/030/103, 2001.

[14] <<http://ustavpatologie.upol.cz/csVyuka.html>> [cit. 2006-12-05]

[15] <http://www.mou.cz/mou/upload/Rubriky/pro_odborniky/protokoly/053.pdf> [cit. 2006-12-17]

[16] NEKULOVÁ M.: Nádory děložního čípku, jejich terapie a vyšetření nádorových markerů, *Labor. Aktuell* 3-4, 2003, 4 - 6.

[17] <<http://www.osel.cz/index.php?clanek=1998>> [cit. 2006-12-17]

[18] KOLEKTIV AUTORŮ: *Lékařské repetitorium*, Galén Praha 2005, ISBN 80 – 7262 – 351 – 6, 274 – 281, 346.

[19] KOLOMBO I. A KOL.: Prostatický specifický antigen (PSA) a digitální rektální vyšetření (DRE) v diagnostice karcinomu prostaty, *Urologie pro praxi* 9 (2), 2008, 83 – 88.

[20] ŠIMÍČKOVÁ M., NEKULOVÁ M., ČERNOCH M., VALÍK D.: Nádorové markery 2001, Roche, Praha 2001.

[21] Nádorové markery a jejich stanovení, Immunotech, Praha 1999.

[22] RACEK J. A KOL.: *Klinická biochemie*, Galén 2006, ISBN 80 – 7262 – 324 – 9, 247 – 257.

[23] ZIMA T.: *Laboratorní diagnostika*, Galén, Praha, ISBN 80 – 7262 – 201 – 3, 331 – 340.

[24] STURGEON C., ARONSSON A. C., DUFFY M. J., HANSSON L. O., KLAPDORF R., VAN DALEN A. ET AL. (volně přeložila RNDr. Marta Šimíčková): Doporučení pro vyšetřování nádorových markerů: European Group on Tumor Markers (EGTM) 1999, *We Innovate Healthcare*, ROCHE, 4 - 7.

[25] <<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/MSAAB.htm>> [cit. 2006-12-05]

[26] MIZEJEWSKI G. J.: Biological Roles of Alpha-Fetoprotein During Pregnancy and Perinatal Development, *Experimental Biology and Medicine* 229, 2004, 439 - 463.

[27] MASOPUST J.: Nádorové markery včera, dnes a zítra (1.část), *Labor Aktuell* 2, 2004, 4 – 8.

[28] <<http://www.mzcr.cz/l1.xml/data/c764/lib/msaac.htm>> [cit. 2007-02-04]

[29] JOHNSON P. J.: Role of Alpha-fetoprotein in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma, *J.Gastroenterol.Hepatol.* 14 (Suppl.), 1999, 32 - 36.

[30] <<http://www.mou.cz/mou/upload/jednotl.html>> [cit. 2007-02-03]

[31] KLEIST S.: Introduction to the CEA family, *Int.J.Biol. Marker* 7, 1992, 132 - 136.

[32] <<http://www.mzcr.cz/cgi-bin/toCP852/data/c764/lib/mzady.htm>> [cit. 2007-02-03]

- [33] KLEIST S., MIGULE I., HALLA B.: Possible function of CEA as cell-contact inhibitory molecule, *Anticancer Res.* 15, 1995, 1889 - 1894.
- [34] HÖRIG H., MEDINA F. A., CONKRIGHT W. A., KAUFMAN H. L.: Strategies for cancer therapy using carcinoembryonic antigen vaccines, *Expert Reviews in Molecular Medicine*, Cambridge University Press ISSN 1462 - 3994, 2000.
- [35] TAHERI M., SARAGOVI U., FUKS A., MAKKERH J., MORT J., STANNERS C. P.: Self Recognition in the Ig Superfamily, Identification of precise subdomains in carcinoembryonic antigen required for intercellular adhesion, *J. Biol. Chem.* 275 (35), 2000, 26935 - 26943.
- [36] BAST R.C. ET ASCO TUMOR MARKER EXPERT PANEL: Clinical practice guidelines for the use of tumor marker in breast and colorectal cancer, *J.Clin. Oncol.* 14 (10), 1996, 2843 - 2877.
- [37] FATEH-MOGHADAM A., STIEBER P.: Sensible use of tumor markers, *J. Hartmann Verlag GBMH*, 1993.
- [38] <<http://www.mzcr.cz/data/c764/lib/msaad.htm>> [cit. 2007-02-04]
- [39] TYREY L.: Human chorionic gonadotropin: Properties and assay methods, *Seminars in Oncol.* 22, 1995, 121 - 129.
- [40] <<http://www.chem.gla.ac.uk/protein/glyco/GPH.html>> [cit. 2007-01-30]
- [41] ACEVEDO H. F.: Human chorionic gonadotropin (hCG), the hormone of life and death: a review, *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology* 2 , 2002, 133.

[42] HARA M., INOUE T., KOYANAGI Y. ET AL.: Immuno-electrophoretic studies of the protein components in human seminal plasma (especially its specific component), *Nippon Hoigaku Zasshi* 26, 1972, 78 – 80.

[43] PEŠL M., ZÁMEČNÍK L., SOUKUP V., DVOŘÁČEK J.: Prostatický specifický antigen a odvozené parametry, *Urologie pro praxi* 2, 2004, 59 – 63.

[44] <<http://www.mzcr.cz/l1.xml/data/c764/lib/msaai.htm>> [cit. 2007-02-04]

[45] ŠTERN P., VRANOVSKÝ K.: Imunochemické markery benigní hyperplazie a karcinomu prostaty, ÚKBLD VFN a 1.LF UK, KKB IPVZ Praha, Olympus C&S, FONS 2006.

[46] DOHERTY A., CRISTMAS T., EPSTEIN R.: Molecular and clinical aspects of prostate-specific antigen, *Tumor Marker Update* 9, 1997, 33 - 38.

[47] BRAWER M. K.: Prostate specific antigen, *Seminars in Surg.Oncol.* 18, 2000, 3 - 9.

[48] <<http://www.mzd.cz/data/c764/lib/msaar.htm>> [cit. 2007-01-31]

[49] COOPER E.H.: Neuron-specific enolase, *Int.J. Biol.Markers* 9, 1994, 205 - 210.

[50] BAUDIN E., GIGLIOTTI A., DUCREUX M., ROPERS J., COMOY E., SABOURIN J. C., BID J. M., CAILLEUX A. F., BONACCI R., RUFFIE P., SCHLUMBERGER M.: Neuron-specific enolase and chromogranin A as markers of neuroendocrine tumours, *Br.J.Cancer* 78, 1998, 1102 -1107.

[51] O'BRIEN T.J., TANIMOTO H., KONISHI I., GEE M.: More than 15 years of CA 125: What is known about the antigen, its structure and function, *Int.J.Biol.Markers* 13, 1998, 188 -195.

[52] Special Issue: CA 125 fifteen years later, *Int. J. Biol. Markers* 13, 1998, 177 - 245.

[53] <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS3/hypertext/MSAAR.htm>

[cit. 2007-01-31]

[54] MEYER T., RUSTIN G. J. S.: Role of tumor markers in monitoring epithelial ovarian cancer, *Br.J.Cancer* 82, 2000, 1535 - 1538.

[55] BAST R.C. ET ASCO TUMOR MARKER EXPERT PANEL: Clinical practice guidelines for the use of tumor marker in breast and colorectal cancer, *J.Clin. Oncol.* 14, 1996, 2843 - 2877.

[56] ZHANG H. G., QI C., WANG Z. H., JIN G. AND XIU R. J.: Evaluation of a New CA15-3 Protein Assay Method: Optical Protein-Chip System for Clinical Application, *Clinical Chemistry* 51, 2005, 1038 - 1040.

[57] <<http://www.mzcr.cz/l1.xml/data/c764/lib/msaae.htm>> [cit. 2007-03-04]

[58] NECHTĚL B., WAND A. J., WROBLEWSKI K., KOPROWSKI H., THURIN J.: Conformational Analysis of the Tumor-associated Carbohydrate Antigen 19-9 and Its Le^a Blood Group Antigen Component as Related to the Specificity of Monoclonal Antibody CO19-9, *The Journal of Biological Chemistry* 265 (4), 1990, 2028 - 2037.

[59] FABRIS C., FALETTI E., PIRISI M., SOARDO G., TONIUTO P., VITULI D., BERTOLOTTI N., GONANO F., BARTOLI E.: Non-specific increase of serum carbohydrate antigen CA 19-9 in patients with liver disease associated

with increased circulating levels of adhesion molecules, *Clin. Chim. Acta* 243, 1995, 25 - 33.

[60] FUJITA J., DOBASHI N., OHTSUJI Y., UEDA Z., BANDO S., YAMADORI I., TAKAHARA J.: Detection of large molecular weight cytokeratin 8 as a carrier protein of CA 19-9 in non-small-cell-lung cancer, *Br.J.Cancer* 81, 1999, 769 - 773.

[61] GREM J.: The prognostic significance of tumor markers in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract, *Curr. Opin. Oncol.* 9, 1997, 380 - 387.

[62] KATARI R.S., FERNSTEN P.D., SCHLOM J.: Characterization of the shed form of the human tumor-associated glycoprotein (TAG-72) from serous effusions of patients with different types of carcinomas, *Cancer Res.* 50, 1990, 4885 - 4890.

[63] GUADANI F., ROSELLI M., FERRONI P., SPILA A., CAVALIERE F., CASALDI V., WAPNER G., ABBOLITO M. R., GREINER J. W. ET AL.: CA 72-4 serum marker - a new tool in the management of carcinoma patients, *Cancer Invest.* 13, 1995, 227 - 238.

[64] <<http://www.mzcr.cz/toISO-8859-2/data/c764/lib/ajaow.htm>> [cit. 2007-03-17]

[65] THEIL E. C.: Ferritin: At the Crossroads of Iron and Oxygen Metabolism, *The American Society for Nutritional Sciences J. Nutr.* 133, 2003, 1549 - 1553.

[66] MOORE G. R., CHEESMAN M. R., KADIR F. H. A., THOMSON A. J., YEWDALL S. J., HARRISON P. M.: Spectroscopic identification of the haem axial ligands of haemoferritin and location of possible haem-binding sites in ferritin by molecular modelling, *Biochem. J.* 287, 1992, 457 - 460.

[67] KEIR G., TASDEMIR N., THOMPSON E. J.: Cerebrospinal fluid ferritin in brain necrosis: evidence for local synthesis, *Clin Chim Acta.* 216 (1-2), 1993, 153 - 166.

[68] Herbert V., Jayatilleke E., Shaw S., Rosman A. S., Gardina P., Grady R. W., Bowman B., Gunter E. W.: Serum Ferritin Iron, a New Test, Measures Human Body Iron Stores Unconfounded by Inflammation, *Stem Cells* 15, 1997, 291 - 296.

[69] JACOBS A., PATH F. R., WOORWOOD M.: Ferritin in serum clinical and biochemical implications, *N Engl J Med* 292, 1975, 951 - 956.

[70] <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/KVABN.htm>

[cit. 2007-01-31]

[71] <<http://www.biovendor.cz>> [cit. 2009-05-21]

[72] VALÍK D., ZIMA T., TOPOLČAN O. A KOL.: Doporučení České společnosti klinické biochemie (ČSKB ČLS JEP), České onkologické společnosti (ČOS ČLS JEP), České společnosti nukleární medicíny (ČSNM ČLS JEP) – sekce imunoanalytických metod k využití nádorových markerů v klinické praxi, *Klinická biochemie a metabolismus* 17, 03/2009, 42 – 54.

