

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NANA KAPUS

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017



UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NANA KAPUS

POMEN TIMIDIN KINAZE V LABORATORIJSKI  
DIAGNOSTIKI RAKA DOJKE

THYMIDINE KINASE IN LABORATORY DIAGNOSTICS OF  
BREAST CANCER

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017



Magistrsko nalogo sem opravljala na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom dr. Gašperja Pilka, dr. med. Meritve aktivnosti timidin kinaze so bile izvedene na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, karcinomskega antigena 15-3 v okviru rutinske obravnave na Onkološkem inštitutu Ljubljana, meritve koncentracije timidin kinaze pa na Švedski univerzi za agrikulturne znanosti v Uppsali.

### **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorju dr. Gašperju Pilku, dr. med. za vso pomoč pri izdelavi magistrske naloge. Rada bi se zahvalila tudi staršema, ki sta mi omogočila študij, ter celotni družini in Jerneju za podporo.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorja dr. Gašperja Pilka, dr. med.

Nana Kapus

# Vsebina

---

Kazalo slik .....	viii
Kazalo preglednic .....	x
<b>1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Rak dojke .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Anatomija dojke.....	1
1.1.2. Patofiziologija raka dojke .....	1
1.1.3. Dejavniki tveganja .....	2
1.1.4. Različne oblike raka dojke.....	3
1.1.5. Klasifikacija raka dojke .....	5
<b>1.2. Diagnostika raka dojke .....</b>	<b>6</b>
1.2.1. Slikovni testi za diagnostiko .....	6
1.2.2. Biopsija .....	7
1.2.3. Druge možnosti diagnostike .....	8
<b>1.3. Tumorski označevalci.....</b>	<b>8</b>
1.3.1. Kaj so tumorski označevalci? .....	8
1.3.2. Tumorski označevalci pri raku dojke .....	11
1.3.3. CA 15-3 .....	12
1.3.4. Karakterizacija timidin kinaze .....	12
1.3.5. Timidin kinaza in rak dojke .....	13
<b>1.4. Zdravljenje .....</b>	<b>14</b>
1.4.1. Lokalno zdravljenje .....	14
1.4.2. Sistemsko zdravljenje .....	15
<b>2. Namen dela .....</b>	<b>16</b>
<b>3. Materiali in metode .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1. Odvzem in priprava vzorcev .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2. CA 15-3 .....</b>	<b>17</b>
3.2.1. Princip metode .....	17
3.2.2. Reagenti .....	18
3.2.3. Postopek meritve .....	18
<b>3.3. Aktivnost timidin kinaze .....</b>	<b>19</b>
3.3.1. Princip metode .....	19

3.3.2. Reagenti .....	20
3.3.3. Postopek meritve .....	21
<b>3.4. Koncentracija timidin kinaze .....</b>	<b>21</b>
3.4.1. Princip metode .....	21
3.4.2. Reagenti .....	22
3.4.3. Postopek meritve .....	22
<b>3.5. Statistična obdelava .....</b>	<b>23</b>
<b>4. Rezultati .....</b>	<b>24</b>
4.1. Vzorci.....	24
4.2. CA 15-3 .....	25
4.3. Aktivnost TK.....	29
4.4. Koncentracija TK .....	33
4.5. Kvocient aktivnost TK/koncentracija TK.....	37
4.6. Korelacije med posameznimi tumorskimi označevalci .....	41
<b>5. Razprava .....</b>	<b>43</b>
<b>6. Sklep .....</b>	<b>47</b>
<b>7. Literatura.....</b>	<b>48</b>
<b>8. Priloga .....</b>	<b>50</b>

## Kazalo slik

---

Slika 1.1: Duktalni karcinom in situ (3). .....	3
Slika 1.2: Lobularni karcinom in situ (3). .....	4
Slika 1.3: Aspiracijska tankoigelna biopsija (3). .....	7
Slika 1.4: Specifičnost in občutljivost tumorskega označevalca glede na referenčno vrednost (8). .....	10
Slika 1.5: Fosforilacija timidina v timidin monofosfat ob prisotnosti TK (10). .....	12
Slika 3.1: Analizator DiaSorin LIAISON® XL (16). .....	20
Slika 3.2: Postopek direktne ELISE (17). .....	22
Slika 4.1: Razporeditev bolnic glede na stadij raka dojke. ....	24
Slika 4.2: Vrednosti CA 15-3 pri bolnicah v primerjavi s kontrolno skupino. ....	26
Slika 4.3: ROC krivulja za CA 15-3. ....	27
Slika 4.4: Meritve CA 15-3 glede na stadij raka dojke v primerjavi s kontrolno skupino. ....	28
Slika 4.5: ROC krivulja za aktivnost TK. ....	30
Slika 4.6: Meritve aktivnosti TK pri bolnicah v primerjavi s kontrolno skupino. ....	30
Slika 4.7: Meritve aktivnosti TK pri začetnih in poznih stadijih raka dojke v primerjavi s kontrolno skupino. ....	32
Slika 4.8: ROC krivulja za koncentracijo TK. ....	34
Slika 4.9: Meritve koncentracije TK pri bolnicah v primerjavi s kontrolno skupino. ....	34
Slika 4.10: Meritve koncentracije TK pri začetnih in poznih stadijih raka dojke ter kontrolni skupini. ....	36
Slika 4.11: ROC krivulja za kvocient aktivnost TK/koncentracija TK. ....	38
Slika 4.12: Izračunani kvocient med aktivnostjo TK in koncentracijo TK pri bolnicah v primerjavi s kontrolno skupino. ....	38
Slika 4.13: Izračunani kvocienti aktivnost TK/koncentracija TK pri začetnih stadijih, poznih stadijih in kontrolni skupini. ....	40
Slika 4.14: Korelacijski diagram med aktivnostjo TK in kvocientom aktivnost TK/koncentracija TK. ....	42



Slika 4.15: Korelacijski diagram med koncentracijo TK in kvocientom aktivnost TK/koncentracijo TK. ....	42
---	----

## Kazalo preglednic

---

Preglednica I: Izračun občutljivosti in specifičnosti tumorskega označevalca (7). .....	9
Preglednica II: Sestava reagenčnega integrala za določitev CA 15-3 z aparatom DiaSorin LIAISON® XL (14). .....	18
Preglednica III: Reagenti za določitev aktivnosti TK z aparatom DiaSorin LIAISON® XL (15). .	20
Preglednica IV: Reagenti, uporabljeni pri direktni TK 210 ELISI (18). .....	22
Preglednica V: Rezultati Mann-Whitneyevega testa za CA 15-3. ....	25
Preglednica VI: Parametri statistične analize ter občutljivost in specifičnost CA 15-3 pri bolnicah in kontrolni skupini. ....	26
Preglednica VII: Rezultati Mann-Whitneyevega testa za CA 15-3 pri začetnih in poznih stadijih raka dojke in kontrolni skupini. ....	27
Preglednica VIII: Parametri deskriptivne statistične analize ter občutljivost in specifičnost CA 15-3 pri skupini začetnih stadijev in skupini poznih stadijev raka dojke v primerjavi s kontrolno skupino. ....	28
Preglednica IX: Rezultati Mann-Whitneyevega testa za aktivnost TK. ....	29
Preglednica X: Rezultati deskriptivne analize in občutljivosti ter specifičnosti aktivnosti TK pri bolnicah in kontrolni skupini. ....	29
Preglednica XI: Rezultati Mann-Whitneyevega testa za aktivnost TK pri začetnih in poznih stadijih in kontrolni skupini. ....	31
Preglednica XII: Parametri deksriptivne analize in občutljivost ter specifičnost aktivnosti TK glede na stadij raka dojke v primerjavi s kontrolno skupino. ....	32
Preglednica XIII: Rezultati Mann-Whitneyevega testa za koncentracijo TK. ....	33
Preglednica XIV: Rezultati deskriptivne analize z občutljivostjo in specifičnostjo za koncentracijo TK pri bolnicah in kontrolni skupini. ....	33
Preglednica XV: Rezultati Mann-Whitneyevega testa za koncentracijo TK med skupinama začetnih in poznih stadijev ter kontrolne skupine. ....	35
Preglednica XVI: Parametri deskriptivne statistične analize z izračuni občutljivosti in specifičnosti koncentracije TK pri začetnih in poznih stadijih ter kontrolni skupini. ....	36

Preglednica XVII: Rezultati Mann-Whitneyevega testa za kvocient aktivnost TK/koncentracija TK. .....	37
Preglednica XVIII: Rezultati deskriptivne analize in izračun občutljivosti in specifičnosti za kvocient aktivnost TK/koncentracija TK.....	37
Preglednica XIX: Rezultati Mann-Whitneyevega testa za kvocient aktivnost TK/koncentracija TK pri skupinah začetnih in poznih stadijev ter kontrolni skupini. ....	39
Preglednica XX: Rezultati deskriptivne analize z občutljivostjo in specifičnostjo za kvocient aktivnost TK/koncentracija TK pri začetnih stadijih, poznih stadijih in kontrolni skupini. ....	40
Preglednica XXI: Spearmanovi koeficienti korelacije med posameznimi tumorskimi označevalci. .....	41
Preglednica XXII: Pregled meritev vseh tumorskih iznačevalcev pri vseh bolnicah skupaj. ....	50
Preglednica XXIII: Meritve aktivnosti TK, koncentracije TK in izračun kvocienta aktivnost TK/koncentracija TK pri kontrolni skupini.....	52
Preglednica XXIV: Pregled meritev CA 15-3 v kontrolni skupini. ....	53

## Povzetek

---

Dojka je največja kožna žleza, sestavljena je iz večih režnjev, te pa sestavljajo posamezne žlezne enote. Iz njih izhajajo izvodilni kanali, ki se stekajo proti prsni bradavici. Rak dojke je najpogostejša oblika raka pri ženskah. Ločimo več različnih vrst raka dojke, glede na mesto nastanka, hormonsko odzivnost in dednost. Pomemben del diagnostike, spremljanja odziva na zdravljenje, predvidevanja poteka in odkrivanja ponovnega pojava bolezni predstavlja laboratorijska določitev tumorskih označevalcev v telesnih tekočinah bolnic.

Timidin kinaza je encim, ki fosforilira timidin v timidin monofosfat ob prisotnosti molekule adenozin trifosfat in je pomemben pri celični delitvi. Poznamo dva izoencima. Timidin kinaza 1 je prisotna v citoplazmi celic, njena količina pa je odvisna od celičnega cikla. Timidin kinaza 2 ni odvisna od celičnega cikla, prisotna pa je v mitohondrijih. Visoke vrednosti timidin kinaze 1 v serumu že dlje časa povezujejo z malignimi procesi v telesu.

V laboratorijski diagnostiki raka dojke se pogosto določa tumorski označevalec karcinomski antigen 15-3. V magistrski nalogi smo bolnice ob diagnosticiranem raku dojke razdelili na skupino z začetnimi stadiji in skupino s poznimi stadiji raka dojke. Obravnavali smo tudi vse bolnice skupaj kot celoto. Nato smo jim določili serumske vrednosti aktivnosti in koncentracije timidin kinaze ter izračunali kvocient med aktivnostjo in koncentracijo timidin kinaze. Rezultate smo primerjali s karcinomskim antigenom 15-3.

Odkrili smo, da vrednosti aktivnosti in koncentracije timidin kinaze ter kvocienta med aktivnostjo in koncentracijo timidin kinaze naraščajo sorazmerno s stadijem raka dojke. Vsi tumorski označevalci izkazujejo višjo občutljivost tako v začetnih kot tudi poznih stadijih raka dojke kot karcinomski antigen 15-3, medtem ko je specifičnost nekoliko nižja. Statistično pomembno korelacijo smo dokazali med aktivnostjo timidin kinaze in kvocientom ter med aktivnostjo in koncentracijo timidin kinaze, negativno povezanost med koncentracijo timidin kinaze in kvocientom, med ostalimi označevalci pa povezava ni statistično pomembna. Za še boljšo interpretacijo rezultatov bi potrebovali dodatne podatke o velikosti posameznih tumorjev.

## Abstract

---

Breast is the largest skin gland in the body. It consists of lobules, clusters of alveoli, and ducts, which converge on the nipple. Breast cancer is the most common cancer in women. There are many different types of breast cancer according to the site of formation, receptor status and genetics. Determination of tumor markers in body fluids has an important role in diagnostics, monitoring the course of treatment, prognosis and reoccurrence of breast cancer.

Thymidine kinase is an enzyme that phosphorylates thymidine into thymidine monophosphate in the presence of adenosine triphosphate. It has an important role in cell division. There are two isoenzymes known. Thymidine kinase 1 is present in cytoplasm and it depends on the cell cycle. Thymidine kinase 2 does not depend on the cell cycle and is present in mitochondria. High levels of thymidine kinase 1 in serum has been linked to malignancies.

Levels of carcinoma antigen 15-3 are often determined in laboratory diagnostics of breast cancer. In this master thesis, we separated patients according to stage of breast cancer. In one group we have patients with early stage breast cancer and in other with late stage. In one group we have all our patients. Then we determined activity and concentration of thymidine kinase in serum and calculated the quotient between activity and concentration of thymidine kinase. The results are compared to carcinoma antigen 15-3.

We discovered that activity and concentration of thymidine kinase and quotient between activity and concentration of thymidine kinase increase relatively to the stage of cancer. All tumor markers have higher sensitivity in lower and higher stages of breast cancer than carcinoma antigen 15-3, while specificity is a bit lower. There is a statistically important correlation between activity of thymidine kinase and quotient as well as between activity and concentration of thymidine and negative correlation between concentration of thymidine kinase and quotient. There is no statistically important correlation between other tumor markers. We would need more data about the size of tumors for better interpretation of the results.

## Ključne besede

---

rak dojke, tumorski označevalci, timidin kinaza, karcinomski antigen 15-3, laboratorijska diagnostika

## Key words

---

breast cancer, tumor markers, thymidine kinase, carcinoma antigen 15-3, laboratory diagnostics

## Seznam uporabljenih okrajšav

---

Oznaka	Pomen
ATP	adenozin trifosfat
AZT	3'-azido-3'-deoksitimidin
AZTMP	3'-azido-3'-deoksitimidin monofosfat
BSA	goveji serumski albumin
CA	karcinomski antigen
ELISA	imunoencimski test na trdni podlagi
HER-2	receptor 2 za humani epidermalni rastni faktor
IQR	interkvartilni razmik
MAX	najvišja vrednost
MIN	najnižja vrednost
OS	celotno preživetje
PV	povprečna vrednost
RFS	preživetje brez ponovitve
SD	standardni odklon
TK	timidin kinaza
TNM	tumor, nodes, metastasis
$\rho$	Spearmanov koeficient korelacije

# **1. Uvod**

## **1.1. Rak dojke**

### **1.1.1. Anatomija dojke**

Dojka je največja kožna žleza, ki se pri ženskah navadno razvija do 18. leta starosti. Sestavljena je iz večih režnjev, ki jih tvorijo posamezne žlezne enote (lobusi). V vsaki dojki je 15 do 20 samostojnih žleznih enot, vsaka od njih pa ima svoj izvodilni kanal (duktus), ki se steka proti prsni bradavici. Tam se z majhnimi odprtnicami odpirajo izvodilni kanali, pred tem pa se iz manjših združijo v večje. Med posameznimi žleznimi enotami in izvodilnimi kanali se nahaja vezivno tkivo in maščevje, ter krvne in limfne žile. Večina limfnih žil iz dojke odteka v bezgavke pod pazduho, ali pa v bezgavke pod in nad ključnico (1).

### **1.1.2. Patofiziologija raka dojke**

Rak je bolezen, ki izvira iz spremembe v celičnem genomu. Prihaja do okvarjenega nadzora celične delitve in okvare odmiranja celic, kar se kaže kot nekontrolirano razmnoževanje celic. Prizadeti so geni, ki vplivajo na procese medceličnega sporočanja, celičnega razmnoževanja, popravljanja genoma in druge. To so geni, ki jih prištevamo med protoonkogene, ki se morajo za razvoj raka aktivirati, in tumor zavirajoče gene, ki se pri razvoju raka inaktivirajo. Sprva nastane tumor, ki je lokaliziran. Tumor je skupek avtonomnih celic brez fiziološkega pomena za telo. Če je rak agresiven, lahko razseva po telesu in tumorji se pojavijo še na drugih delih telesa (2).

Rak dojke je rak, ki prizadene celice dojke. V večini primerov raka dojke se rakave spremembe začnejo v celicah izvodilnih kanalov (duktalni rak dojke), v manjšini pa se bolezen začne v celicah žleznihi enot (lobularni rak dojke). Zelo redko je možno tudi, da so primarno prizadete celice drugih tkiv v dojki, na primer vezivno ali maščobno tkivo. Bolezen se začne kot maligni tumor, ki pa se lahko invazivno širi v okolišna tkiva in razseva v druge dele telesa, do česar pride, če je rak agresiven in njegove celice prehajajo v krvne in limfne žile.

Najpogostejši simptom raka dojke je zatipanje nove zatrdline v dojki. Običajno so to trde zatrdline z neravnimi robovi, ki ne bolijo, redkeje pa so lahko tudi mehke, zaokrožene in boleče. Rak dojke se v določenih primerih lahko razširi tudi v bezgavke pod pazduho, kar povzroči njihovo otekanje in postanejo dovolj velike, da jih otipamo. Med pogoste simptome, ki lahko spremljajo bolezen, štejemo tudi bolečino v dojki ali bradavici, vnetje kože dojke ali bradavice, otekanje dojke, nenavaden izcedek iz bradavice in obračanje bradavice navznoter (3).

### **1.1.3. Dejavniki tveganja**

Poznamo več različnih dejavnikov tveganja za razvoj raka dojke. V grobem jih razdelimo na tiste, na katere lahko vplivamo, in na tiste, na katere sami nimamo vpliva. Vplivamo lahko na dejavnike tveganja, ki so povezani z življenjskim slogom posamezne ženske ali z okoljem v katerem živi. Nobenega vpliva pa nimamo na genetske dejavnike tveganja in dejavnike tveganja, kot so na primer ženski spol in starost.

Med dejavnike tveganja, ki so povezani z življenjskim slogom, štejemo naslednje: uporaba peroralnih kontraceptivov in nadomestne hormonske terapije (kombinirane), uživanje alkohola in debelost. Uporaba peroralnih kontraceptivov rahlo zveča možnost za obolenje ženske za rakom dojke, a se le ta po nehanju jemanja ponovno znižuje. Na drugi strani pa zgodnje rojstvo otrok in večkratna nosečnost, ter s tem tudi povezano dojenje, zmanjšata tveganje za obolenje za rakom dojke. Nekatere novejšje raziskave so pokazale, da je tudi dolgoletno kajenje povezano s povečanim tveganjem za obolenje.

Med glavna dejavnika tveganja, na katere ne moremo vplivati, spadata staranje in ženski spol. Rak dojke se lahko pojavi tudi pri moških, a je pri ženskah bolezen vsaj stokrat



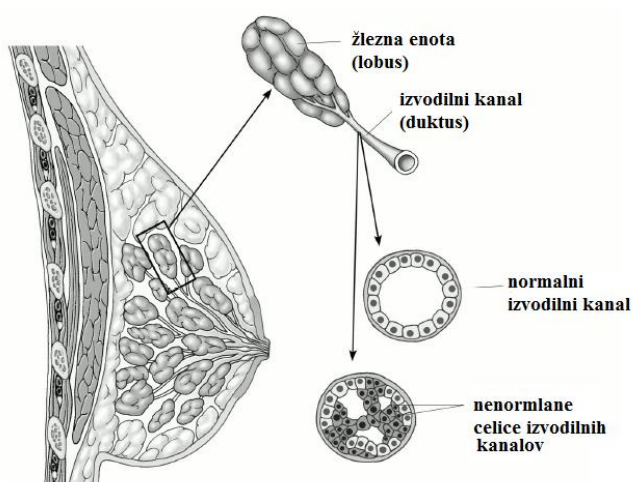
pogostejša. Med te dejavnike tveganja spadajo tudi: družinska in osebna zgodovina raka dojke, bela rasa, gosto tkivo dojke, benigne bolezni dojke, večje število menstrualnih ciklov zaradi zgodnje menstruacije ali pozne menopavze, obsevanje prsi kot terapija za drugo obliko raka in povečana izpostavljenost dietilstilbestrolu.

Rak dojke je lahko v 5-10 % tudi deden, kar pomeni, da izvira direktno iz mutacije gena, ki smo jo podedovali po starših. Najpogostejši vzrok dedne oblike bolezni je podedovana mutacija na genih BRCA1 in BRCA2, ki spadata med tumor zavirajoče gene. Med tumor zavirajoče gene, katerih mutacija lahko povzroči dedno obliko raka dojke spadata tudi gena PTEN in TP53. Bolj pogosta kot dedovana mutacija določenega gena, je mutacija, ki jo pridobimo tekom življenja. To lahko povzročijo različna sevanja in kancerogene kemikalije v okolju (3).

#### 1.1.4. Različne oblike raka dojke

Raka dojke lahko razdelimo v več podskupin, glede na njego patohistologijo. Raka dojke največkrat uvrščamo med adenokarcinome, to je takrat, kadar se rakave spremembe začnejo v žleznih celicah dojke. Če se rakave spremembe začnejo v maščobnem, mišičnem ali vezivnem tkivu dojke, govorimo o sarkomu. V nadaljevanju so predstavljene nekatere najpogostejše oblike raka dojke.

Duktalni karcinom in situ, prikazan na sliki 1.1, je oblika raka dojke, kjer se rakave spremembe pojavijo v celicah izvodilnih kanalov.

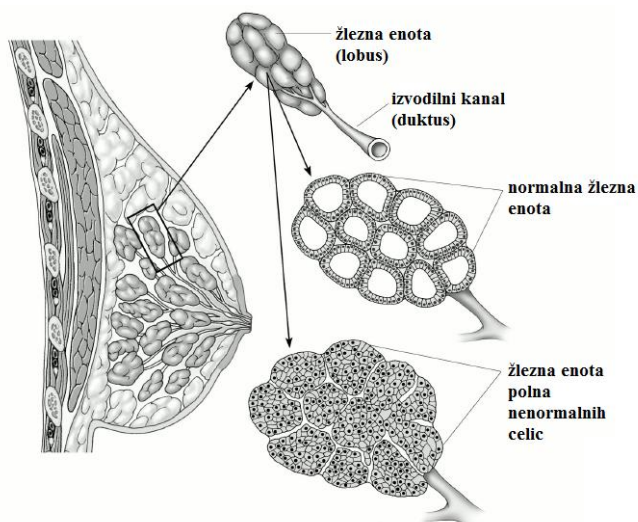


Slika 1.1: Duktalni karcinom in situ (3).

To je neinvazivna oblika raka, tumorske celice se še niso razširile v okolišno tkivo in ne morejo razsevati po telesu. Pojavlja se v približno 20 % vseh diagnosticiranih rakov dojke. Na tej stopnji je možnost ozdravitve skoraj popolna.

Invazivni duktalni karcinom je najpogostejša oblika raka dojke. Prav tako se rakave spremembe začnejo v celicah mlečnih vodov. Rakave celice so invazivne in prehajajo tudi v okolišno tkivo, to pa jim omogoča razsevanje po telesu preko krvnih in limfnih žil. Približno 80 % invazivnih rakov dojke je diagnosticiranih kot invazivni duktalni karcinom.

Lobularni karcinom se začne z rakavimi spremembami v celicah žleznihi enot. Poznamo invazivno obliko in obliko in situ. Pri invazivni obliki, se rakave celice širijo v okolišno tkivo in lahko razsevajo po telesu. Pojavlja se v približno 10 % invazivnih oblik raka dojke. Lobularni karcinom se lahko pojavi tudi in situ, kjer tumorske celice ne prehajajo skozi steno žleznihi enot. Prikazan je na sliki 1.2.



Slika 1.2: Lobularni karcinom in situ (3).

Med manj pogoste oblike raka dojke spadajo še vnetni rak dojke, Pagetova bolezen dojke, filoidni tumor dojke in angiosarkom dojke.

Raka dojke lahko delimo tudi glede na hormonske receptorje, ki jih izražajo rakave celice. Normalne celice tkiva dojke izražajo receptorje, ki lahko vežejo tako estrogen kot tudi progesteron. Rakave celice lahko prav tako izražajo ali estrogenske ali progesteronske

receptorje, ali pa obojne. Rak, katerega celice izražajo estrogenske receptorje, imenujemo ER-pozitivni, tistega, ki izraža progesteronske, pa PR-pozitivni.

Poznamo še delitev raka dojke glede na izražanje receptorja 2 za humani epidermalni rastni faktor (HER-2). Raka, katerega celice, proizvajajo povečano količino HER-2 proteina, imenujemo HER-2 pozitivni rak dojke. Če povzamemo, raka dojke lahko klasificiramo kot: hormonsko pozitivni, hormonsko negativni, HER-2 pozitivni, HER-2 negativni, trojno pozitivni ali trojno negativni, upoštevajoč izražanje hormonskih receptorjev in HER-2 receptorja v rakavih celicah (3).

### **1.1.5. Klasifikacija raka dojke**

Stadij raka dojke se običajno določi po standardiziranem "tumor, nodes, metastasis" (TNM) sistemu po pregledu rakavih celic, odvzetih z biopsijo oziroma po operaciji. Sistem temelji na črkah T, N in M, ki predstavljajo velikost tumorja, število bezgavk, ki so že zajete z rakavimi celicami in ali rak že razseva po telesu. Črki T sledi številka od 0 do 4, ki pomeni velikost primarnega tumorja. Oznaka *is* ob črki T pomeni karcinom in situ. Večja številka pomeni večjo velikost tumorja. Črki N sledi številka od 0 do 3, ki nam pove, ali so rakave celice invadirale v bezgavke in koliko jih je že prizadetih. Večje število pomeni večje število že prizadetih bezgavk. Število 0 ob črki M pove, da do razsevanja po telesu še ni prišlo, 1 pa da rak dojke že razseva po telesu.

Glede na to klasifikacijo raka dojke nato razdelimo v 5 stadijev, od 0 do IV. Posamezni stadiji se lahko delijo še na podskupine, kar se označuje s črkami. Stadij 0 predstavlja duktalni karcinom in situ, ki še ne invadira v sosednja tkiva, oziroma Pagetovo bolezen dojke. Stadiji se nato stopnjujejo glede na napredovanje bolezni. Pod najvišji stadij, stadij IV, se šteje rak dojke, katerekoli velikosti, ki se pojavlja v okolišnih bezgavkah in že razseva po telesu. Petletno preživetje za stadij 0 je 100 %, prav tako tudi za stadij I. Petletno preživetje za stadij II znaša 93 %, za stadij III 72 %, medtem ko je za stadij IV le 22 % (3).

## 1.2. Diagnostika raka dojke

### 1.2.1. Slikovni testi za diagnostiko

Med slikovne teste za diagnostiko raka dojke štejemo tiste, ki za nastanek slik tkiva dojke izkoriščajo rentgenske žarke, magnetna polja, ultrazvočne valove ter radioaktivne spojine. S pomočjo teh tehnik lahko potrdimo sum na raka dojke, določimo kje točno se tumor nahaja in ali je že prišlo do razsevanja po telesu, ter spremljamo odzive na zdravljenje. V nadaljevanju so predstavljene tri najpomembnejše slikovne tehnike diagnostike.

Rentgen, pri katerem slikamo dojko, stisnjeno med dve plošči, imenujemo mamogram. Za pridobitev slike tkiva dojke se uporabljajo rentgenski oziroma x-žarki. Dojko se za boljšo napovednost običajno slika iz dveh zornih kotov. Mamogram se uporablja predvsem kot presejalni test za širšo populacijo žensk (3). V Sloveniji od leta 2008 poteka državni presejalni program za raka dojk DORA, v okviru katerega so vse ženske med 50. in 69. letom vabljeni na pregled z mamografijo (4).

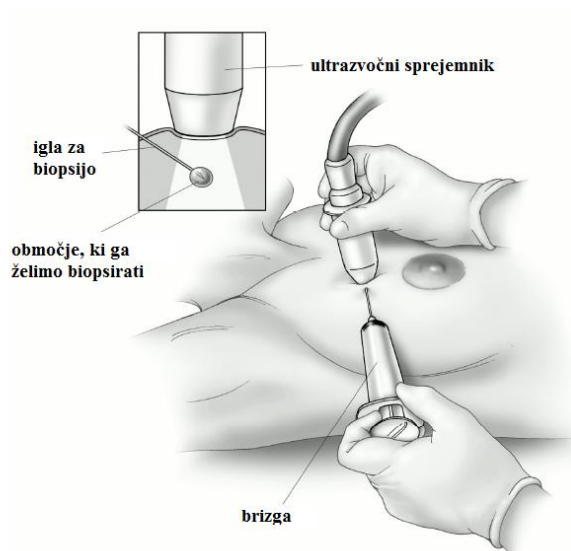
Ultrazvok prsi za pridobitev črnobelega slike tkiva dojke izkorišča zvočne valove, ki se odbijajo od različnih tkiv. Običajno sledi mamogramu, če se tam odkrijejo tvorbe, ki jih je potrebno podrobneje raziskati. Lahko se uporablja tudi kot presejalni test za ženske z večjo stopnjo tveganja za obolenje. Z ultrazvokom je mogoče ločiti med cistami, ki vsebujejo tekočino in trdimi tvorbami, v določenih primerih pa lahko ločimo celo med benignimi in malignimi tumorji. S testom lahko ugotovljamo tudi povečano bezgavk pod pazduho.

Magnetna resonanca temelji na uporabi radijskih valov in močnih magnetnih polj. Za slikanje je potrebna intravenozna aplikacija kontrastnega barvila kot je gadolinij. Z magnetno resonanco lahko določimo točno velikost tumorja in pa tudi, ali rakave celice že razsevajo po telesu. Uporabna je tudi kot presejalni test za ženske z večjim tveganjem za obolenje (3).

## 1.2.2. Biopsija

Biopsija se opravi, ko drugi testi kažejo na prisotnost malignega tumorja. Je edini način da se potrdi, ali je tumor malignen ali ne. Pri biopsiji se vzame vzorec tkiva, ki se ga nato patološko pregleda pod mikroskopom. Poznamo več različnih vrst biopsije, odločitev za posamezno vrsto pa poteka individualno glede na lastnosti posamezne bolnice.

Aspiracijsko tankoigelnno biopsijo, prikazano na sliki 1.3, se opravi s tanko iglo in brizgo, s katero se odvzame del tkiva novonastale tvorbe. Tvorbo se lahko lokalizira s pomočjo tipanja ali ultrazvoka. Poseg se lahko opravi pod lokalno anestezijo ali brez nje. S tem posegom se težko določi ali je rak invaziven ali ne, problem lahko nastopi tudi, če se ne odvzame pravega dela tkiva.



Slika 1.3: Aspiracijska tankoigelnna biopsija (3).

Debeloigelnno biopsijo dojke se opravi z debelejšo iglo, poseg je voden z ultrazvokom ali mamogramom, v določenih ustanovah pa lahko tudi z magnetno resonanco. Poseg se opravlja pod lokalno anestezijo in omogoča boljše diagnostiko. Tkivo je možno odvzeti tudi vakuumsko.

Redkeje se biopsijo opravlja tudi kirurško. Poseg poteka pod splošno ali generalno anestezijo, kirurg lahko odvzame le delček tumorja, ali pa izreže celotnega. Poseg je najbolj invaziven, odvisno od količine odvzetega tkiva, lahko povzroča tudi spremembe v izgledu dojke (3).

### **1.2.3. Druge možnosti diagnostike**

Za zdravljenje raka dojke je zelo pomembno zgodnje odkrivanje bolezni, zato je pomembno, da se ženske spodbuja k rednemu samopregledovanju. Ob odkritju novih zatrdlin je potreben obisk zdravnika, ki opravi celoten fizični pregled, pretipa dojke in tudi bezgavke. Ko se prisotnost raka potrdi, je potrebno še testiranje na prisotnost estrogenskih in progesteronskih receptorjev, prisotnost povečane aktivnosti HER-2 gena ter testiranje različnih genskih mutacij. Pomemben del predstavlja tudi laboratorijska diagnostika raka dojke s pomočjo tumorskih označevalcev, kar je podrobneje predstavljeno v poglavju 1.3.2. Testi, s katerimi ugotovimo, ali je se je rak dojke že razširil po telesu, so rentgen prsnih organov, scintigrafija kosti, računalniška tomografija, magnetna resonanca, ultrazvok ali pozitronska emisijska tomografija (3).

## **1.3. Tumorski označevalci**

### **1.3.1. Kaj so tumorski označevalci?**

Tumorski označevalci so snovi, ki se sintetizirajo in sproščajo iz tumorskih celic, ali pa nastajajo v zdravih celicah kot odziv organizma na tumorske celice. Za njih je značilno, da jih lahko dokažemo v telesnih tekočinah. Kemično so lahko zelo različne molekule, ki se od produktov zdravih celic razlikujejo kvalitativno in kvantitativno. Tumorski označevalci so klinično najbolj uporabni pri določanju stadija raka, izbiranju primerne oblike zdravljenja, sledenju odziva na zdravljenje, predvidevanju poteka bolezni in odkrivanju ponovnega pojava bolezni (5). Kot presejalno metodo jih običajno ne uporabljamo, saj so zaradi nizke specifičnosti za tkivo in organ manj učinkoviti pri odkrivanju primarnega tumorja (6).

S pojmom specifičnost in občutljivost opredelimo uporabnost in vlogo tumorskega označevalca. Specifičnost predstavlja delež preiskovancev z nepovišanim nivojem tumorskega označevalca, ki so zdravi. Redkeje kot se pojavi povišan nivo tumorskega označevalca pri zdravem preiskovancu, bolj je specifičen in manj imamo lažno pozitivnih rezultatov. Občutljivost pa nam pove kakšen delež obolelih preiskovancev ima tudi povišano vrednost tumorskega označevalca. V preglednici I je prikazan izračun specifičnosti in občutljivosti tumorskega označevalca.

Preglednica I: Izračun občutljivosti in specifičnosti tumorskega označevalca (7).

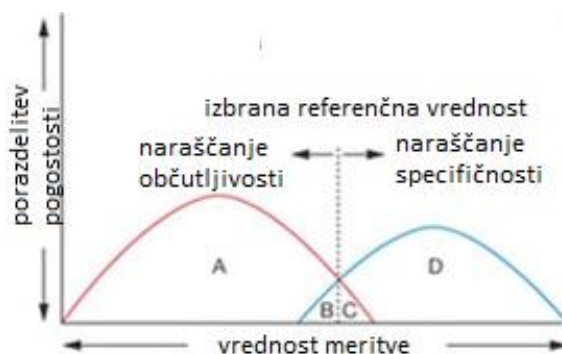
	<b>vrednost tumorskega označevalca je povišana</b>	<b>vrednost tumorskega označevalca je normalna</b>
<b>število bolnikov z določeno maligno boleznijo</b>	A	B
<b>število ljudi brez določene maligne bolezni</b>	C	D
<b>občutljivost = <math>A/(A+B)</math>; specifičnost = <math>D/(C+D)</math></b>		

Več kot je bolnikov s povišano vrednostjo, bolj je tumorski označevalec občutljiv in manj imamo lažno negativnih rezultatov. Idealen tumorski označevalec bi bil tako 100 % občutljiv in specifičen, referenčna vrednost pa bi bila 0. To je tista vrednost, nad katero govorimo o povišanih vrednostih tumorskega označevalca. Je arbitrarno določena vrednost, tako da dobimo ustrezno razmerje med specifičnostjo in občutljivostjo. Običajno je ta vrednost večja od 0, saj kot tumorske označevalce pogosto uporabljamo molekule, ki nastajajo tudi v zdravih celicah (7).

Kot idealni tumorski označevalec štejemo tumorski označevalec z naslednjimi lastnostmi. Tumorski označevalec mora biti visoko analitično občutljiv in specifičen, točen in natančen. Zaželjena je kratka biološka razpolovna doba za lažje spremljanje poteka bolezni in zdravljenja. Metoda za določanje je enostavna in poceni. Pomembna je tudi visoka občutljivost in specifičnost za določeno bolezen, kar pomeni čim manj lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov. Koncentracija tumorskega označevalca naj bi se spreminjala skupaj z velikostjo tumorja. Če je tumorski označevalec v krvi tudi naravno prisoten, mora biti očitna razlika v koncentraciji med fiziološkim in obolelim stanjem. Bolniki v popolni remisiji naj bi imeli komaj zaznavne vrednosti tumorskega označevalca, saj bolezni nimajo, ob ponovnem pojavu bolezni pa naj bi se vrednosti hitro začele ponovno zviševati (5).

Med pomanjkljivosti tumorskih označevalcev bi lahko šteli njihovo nastajanje pri drugih nemalignih boleznih, kot so na primer vnetja, hiperplazije tkiv, benigni tumorji, bolezni

jeter, trebušne slinavke, v nosečnosti in pri različnih povsem fizioloških stanjih. Pogosto tumorski označevalci ni dovolj specifičen za vrsto tumorja. Specifičnost in občutljivost vedno določamo pri referenčni vrednosti, s spreminjanjem le te, pa lahko spreminjamo specifičnost in občutljivost označevalca, kar je prikazano na sliki 1.4.



Slika 1.4: Specifičnost in občutljivost tumorskega označevalca glede na referenčno vrednost (8).

Tumorski označevalci se v telesnih tekočinah nahajajo v zelo nizkih koncentracijah, zato jih običajno dokazujemo po principu določanja kompleksov antigena in protiteles. Najbolj zastopane metode določanja so: radioimunološka, encimimunološka in luminimetrična metoda. Med seboj se razlikujejo predvsem po načinu detekcije nastalega kompleksa in spojini, ki se veže na detekcijska protitelesa, vse pa so visoko občutljive (7). Na koncentracijo tumorskega označevalca v krvi lahko vpliva več različnih faktorjev, kot so velikost, prekrvavljenost ter tip tumorja in njegova razširjenost, hitrost sinteze in sproščanje iz celic oz. njihovih površin, stopnja izražanja tumorskih označevalcev, stopnja nekroze tumorskega tkiva, razpolovni čas tumorskega označevalca ter vpliva protiteles.

Tumorske označevalce je smiselno določati pred in po operacijah, pred, med in po kakršnem koli zdravljenju in pri spremenjeni terapiji, ob sumu na ponovitev ali napredovanje bolezni. Načrt določanja tumorskih označevalcev je potrebno prilagoditi vsakemu bolniku posebej in lastnostim ter vrsti tumorja.

Glede na biokemične lastnosti, mesto nastanka in funkcionalnost, tumorske označevalce delimo v naslednje skupine: onkofetalni proteini, hormoni in/ali karcinoplacentarni antigeni, encimi, tumor spremljajoči antigeni, posebni serumski proteini in mešani označevalci. Onkofetalni proteini običajno pri odraslem v telesu ne nastajajo več, saj se



pojavljajo med embrionalnim razvojem. Njihov pojav pri odraslem lahko povežemo z aktivacijo genov, ki nadzirajo rast celic in tako posledično s pojavom raka. Tudi hormoni so lahko znak rakavega procesa v telesu, saj le ta lahko vpliva na izločanje in sintezo različnih hormonov, ki se lahko poveča ali zmanjša. Pojav tumorjev lahko tako vpliva tudi na povečano koncentracijo ali aktivnost encimov, ki jih lahko uporabimo kot tumorske označevalce. Med tumor spremljajoče antigene štejemo različne membranske strukture rakavih celic, določamo jih predvsem s specifičnimi monoklonskimi protitelesi. Te označevalci so običajno zato bolj specifični za vrsto tumorja in rast oziroma zmanjševanje le tega odražajo zelo natančno. V skupino posebnih serumskih proteinov štejemo različne proteine. Med različne serumske označevalce se uvrščajo različne molekule, ki niso tumorsko specifične, pa vseeno dobro nakazujejo možnost obstoja rakavega obolenja (6).

### **1.3.2. Tumorski označevalci pri raku dojke**

Za diagnostiko raka dojke, spremljanje poteka bolezni, zdravljenja in odkrivanja ponovnega pojava bolezni lahko uporabljamo številne tumorske označevalce. Karcinomska antigena (CA) 15-3 in 27.29 omogočata zaznavanje MUC-1 antigena v periferni krvi. Njunu povišanje po primarnem zdravljenju lahko napove ponovni pojav bolezni, uporabna pa sta tudi za spremljanje zdravljenja pri metastatskem raku dojke, skupaj z drugimi diagnostičnimi metodami. Za enak namen lahko izberemo tudi karcinoembriotski antigen, vendar se ta manj pogosto uporablja kot zgoraj omenjena označevalca. Estrogenske in progesteronske receptorje naj bi se določalo pri vsaki primarni obliki raka dojke kot tudi pri metastatski obliki bolezni. Imajo pomemben vpliv na izbor bolj dovzetnih bolnic na hormonsko terapijo ter so povezani z boljšo prognozo poteka bolezni. Določitev S-faze celičnega cikla s pretočno citometrijo je eden od označevalcev proliferacije. Zvišane vrednosti proliferacije nakazujejo na slabšo prognozo pri nezdravljenih bolnicah in koristi od zdravljenja s kemoterapijo. HER-2 receptor spada med receptorje epidermalnih rastnih faktorjev, povečano izražanje pa nakazuje na slabšo prognozo in večjo agresivnost raka dojke. Testiranje povečanega izražanja HER-2 receptorja je potrebno pri vsaki primarni invazivni obliki bolezni kot tudi pri novem pojavu, predvsem zaradi odločitve o dovzetnosti na tarčno zdravljenje. Povečano izražanje receptorja HER-2 naj bi izražalo tudi koristi od zdravljenja z antraciklini. Urokinazni plazminogeni aktivator/plazminogen aktivator inhibitor je uporaben tumorski označevalec za postavljanje prognoze pri novo

ugotavljenjem raku dojke, ki se še ni razširil v bezgavke. Visoke vrednosti obeh označevalcev so povezane z visokim tveganjem za ponovitev bolezni in smrt (9).

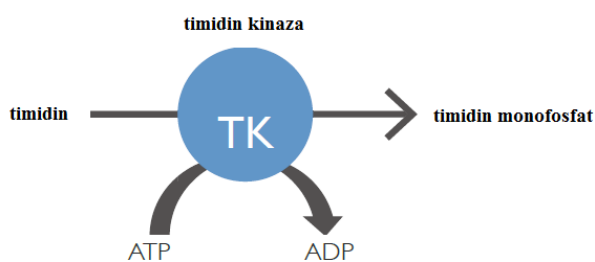
### 1.3.3. CA 15-3

Tumorski označevalec CA 15-3 spada v skupino tumor spremljajočih antigenov (6). CA 15-3 je glikoprotein mucin z molekularno maso 300-450 kDa, ki se nahaja na epiteliju celic dojke. Nastaja tudi na sekretornem epiteliju drugih organov, kot so pljuča, maternica, gastrointestinalni organi in se pogosto pojavlja tudi pri zdravih ljudeh.

Njegovo vrednost se določa pri metastatskih oblikah raka dojke, trebušne slinavke, pljuč, jeter in kolorektalnega raka. CA 15-3 ni specifičen tumorski označevalec za določeno vrsto raka ali za določen organ. Na povečanje koncentracije lahko vplivajo tudi benigni tumorji in nekatere nemaligne bolezni dojke. Določamo ga lahko z dvema različnima protitelesoma, ki se vežeta na različne dele antigena. Kot povečane serumske koncentracije štejemo koncentracije nad 30 U/mL. Je uporaben tumorski označevalec pri bolnicah z rakom dojke v napredovalih oblikah bolezni, kjer je zaznati povečanje v koncentraciji pri 79 % do 92 % bolnic. Pri bolnicah s stadijem I ali II je to povečanje zaznati le pri manj kot 33 % bolnic. Klinično je uporaben označevalec za spremljanje uspešnosti zdravljenja in poteka raka dojke (5, 7).

### 1.3.4. Karakterizacija timidin kinaze

Timidin kinaza (TK) je encim, ki spada v skupino fosfotransferaz. TK fosforilira timidin v timidin monofosfat ob prisotnosti molekule adenozin trifosfata (ATP). (10). Katalizira prenos terminalnega fosfata iz molekule ATP na 5'-hidroksilno skupino timidina. Reakcija je prikazana na sliki 1.5.



Slika 1.5: Fosforilacija timidina v timidin monofosfat ob prisotnosti TK (10).

Primarna vloga encima je torej regulacija zalog intracelularnega timidina skozi celični cikel. V človeških celicah ločimo dve obliki TK. TK1 je izoenzim, ki je odvisen od celičnega cikla in se nahaja v citoplazmi celic. Je S-fazno specifičen encim, kar pomeni, da njegova aktivnost močno naraste v prehodu med fazami celičnega cikla G1 in S, nato pa hitro upade v fazi G2. Najdemo ga v obliki homodimera ali homotetramera. Posamezna monomerna enota je velika 24 kDa. Podatki o velikosti in obliki encima se sicer kar precej razlikujejo glede na uporabljeno metodo izolacije. TK1 je natančno regulirana na večih točkah, transkripcijsko kot tudi post-transkripcijsko. Aktivnost med celičnim ciklom regulirajo tudi določena zaporedja na samem encimu, TK1 promotor pa ima vezavna mesta za faktorje, povezane s celičnim ciklom. Encim je sposoben fosforilirati substratne analoge z modifikacijo na mestih N-3 in C-5 pirimidinskega obroča, kot tudi mesto 3' na ribozi. Fosforilira lahko tudi 5-fluoro-dideoksitimidin in 3-azido-2,3-dideoksitimidin, ki sta prav tako klinično pomembna substratna analoga. Druga oblika encima je TK2, ki je neodvisen od celičnega cikla. Njegova aktivnost ni pogojena z delitvijo celic. Najdemo ga v mitohondrijih celic, kjer igra vlogo v sintezi mitohondrijske deoksiribonukleinske kisline. Naraščanje koncentracije TK1 v serumu že dolgo časa povezujejo z različnimi oblikami raka (11, 12).

### **1.3.5. Timidin kinaza in rak dojke**

TK lahko merimo tudi v serumu in njen porast je sorazmeren proliferaciji celic. Zatorej je TK v serumu povečana pri boleznih, za katere je značilna povečana proliferacija celic ali celična smrt, kot so rak, avtoimunske bolezni in virusne infekcije (10). Za porast aktivnosti encima je odgovoren predvsem izoenzim TK1. Ni še povsem znano s kakšnim mehanizmom se TK izloča v serum. Ena izmed teorij je, da se encim izloča v serum iz celic v celičnem ciklu ter se v njem akumulira in ostane stabilen, ali pa se izloči iz uničenih celic, najverjetneje zaradi imunskega sistema (12).

Zvišane vrednosti serumske TK so bile odkrite tudi pri pacientkah z rakom dojke. V raziskavah so ugotovili, da je visoka vrednost TK korelirala z visoko stopnjo raka dojke in negativnostjo progesteronskih receptorjev, napovedala pa je slabše preživetje brez ponovitve (relapse-free survival, RFS) pri pred-menopavzalni skupini žensk ter slabše celotno preživetje (overall survival, OS) pri po-menopavzalni skupini žensk. Visoke vrednosti TK v serumu so napovedale tudi slabši RFS in OS ne glede na način zdravljenja.

Ugotovljeno je bilo tudi, da visoke vrednosti korelirajo tudi z velikostjo tumorja in negativnostjo hormonskih receptorjev. Odkrili so, da se vrednosti TK signifikantno povečajo 3-6 mesecev pred napredovanjem bolezni. To nakazuje na potencialno uporabnost TK kot uporabnega tumorskega označevalca za predvidevanje ponovitve raka dojke in njegovo zgodnje odkrivanje (11). Študije so pokazale tudi, da merjenje serumske TK lahko ločuje med operabilnimi raki dojke in tistimi, ki so že sistemski in se jih ne da operirati, saj visoke vrednosti serumske TK dobro korelirajo s pojavom zasevkov. Zmožnosti ločevanja med estrogensko pozitivnimi in estrogensko negativnimi oblikami raka dojke s TK študije niso dokazale. Prav tako ni bila dokazana razlika med vrednostmi serumske TK za različne prognostične skupine pred operacijo (12).

## **1.4. Zdravljenje**

### **1.4.1. Lokalno zdravljenje**

Pod lokalno zdravljenje raka dojke štejemo operacijo in obsevanje.

Operacija je zelo pogosta oblika zdravljenja pri večini žensk, manj pa je pogosta pri napredovalih oblikah raka dojke. Glede na obseg operacije ločimo med odstranitvijo celotne dojke (mastektomijo) in odstranitvijo tumorja z delom dojke (tumorektomija). V primeru najdbe rakavih celic v bezgavkah pod pazduho, se lahko odstrani še njih. V dolgotrajnem preživetju ni razlike, katera operacija se opravi, odločitev pa je odvisna od stanja vsake posameznice. V primeru mastektomije se ženska lahko posluži tudi rekonstrukcije dojke.

Obsevanje skoraj vedno sledi operaciji dojke, predvsem če se je opravilo operacijo z odstranitvijo tumorja in le delom dojke. Je primerna oblika zdravljenja tudi za že napredovano obliko raka, ki razseva po telesu. Pred obsevanjem se počaka, da so vsa tkiva, morebiti prizadeta med operacijo, že zaceljena. Če pacientka dobiva tudi kemoterapijo, se počaka, da se le ta zaključi. Ločimo zunanje in notranje obsevanje. Pri zunanjem obsevanju se sevanje iz naprave usmeri v celo dojko, mesto tumorja ali podpazdušne bezgavke, odvisno od posameznega primera. V primeru notranjega obsevanja se med operacijo na mesto tumorja v posebno napravo namesti radioaktivne pelete. Poznamo več vrst

notranjega obsevanja, pogosto se kombinira z zunanjim, a je v splošnem manj pogosta oblika terapije (3).

## 1.4.2. Sistemsko zdravljenje

Med sistemsko zdravljenje spada kemoterapija, hormonska terapija, tarčna terapija in terapija kosti, če se je rak razširil nanje.

Kemoterapija je zdravljenje s citostatiki, ki se aplicirajo intravensko ali peroralno, in delujejo po celem telesu. Daje se v ciklih, ki so sestavljeni iz aplikacije citostatika in obdobja regeneracije. Zdravljenje običajno traja več mesecev, lahko je pred operacijo (neoadjuvantno) ali po njej (adjuvantno). Neoadjuvantno zdravljenje skrči tumor, oceni pa se tudi njegovo reakcijo na zdravila. Adjuvantno zdravljenje uniči še morebitne celice, ki so ostale v telesu po operaciji. Kemoterapija je ustrezna tudi za že napredovane oblike raka dojke, ki se je že razširil po telesu. Običajno se kombinira več zdravilnih učinkovin, pri raku dojke so to najpogosteje antraciklini in taksani. Možne so tudi kombinacije s tarčnimi učinkovinami.

Hormonska terapija je primerna samo za hormonsko odvisne rake dojke. Najpogosteje se uporablja kot adjuvantna terapija, z namenom da ne bi prišlo do ponovitve bolezni. Tamoksifen in toremifen sta selektivna modulatorja estrogenskih receptorjev, kar pomeni, da v določenih tkivih delujeta kot estrogen, v drugih pa anti-estrogensko. Fluvestrant po celem telesu deluje anti-estrogensko. Poznamo še aromatazne inhibitorje, kot sta na primer letrozol in anastrozol, ki znižajo ravni estrogena. Jemljejo se peroralno, učinkoviti pa so le pri ženskah, kjer zaradi menopavze ali farmakološkega posredovanja jajčniki ne delujejo.

Med tarčno terapijo štejemo zdravila, ki delujejo ciljano na znane spremembe v genih. Tako se lahko tarčno cilja na povečano izražanje proteina HER-2. Tako delovanje imata monoklonski protitelesi trastuzumab in pretuzumab in citostatik lapatinib. Uporabljajo se lahko v kombinaciji s kemoterapijo, tako pri začetni kot že napredovani obliki raka dojke.

Če rak dojke že razseva na kosti, lahko z uporabo bisfosfonatov in monoklonskega protitelesa denosumaba preprečujemo bolečine in morebitne zlome (3).

## 2. Namen dela

Merjenje tumorskih označevalcev v telesnih tekočinah lahko pomembno prispeva k diagnostiki in določanju stadija raka, spremljanju odziva na zdravljenje, predvidevanju poteka bolezni in zgodnjemu odkrivanju ponovnega pojava bolezni. V magistrski nalogi smo v raziskavo vključili bolnice z rakom dojke v različnih stadijih bolezni. Raziskovali bomo povezavo aktivnosti in koncentracije serumske TK s stadijem raka dojke in primerjavo z drugim tumorskim označevalcem, CA 15-3. Želeli bomo dokazati naslednje hipoteze:

1. Koncentracija TK narašča glede na stadij bolezni.
2. Aktivnost TK narašča glede na stadij bolezni.
3. Kvocient aktivnosti in koncentracije TK je boljši pokazatelj stadija raka dojke kot posamezen parameter.
4. TK je boljši tumorski označevalec pri raku dojke kot CA 15-3, predvsem v zgodnjih stadijih bolezni.

## **3. Materiali in metode**

### **3.1. Odvzem in priprava vzorcev**

Od januarja do avgusta 2014 je bilo na Onkološkem inštitutu Ljubljana odvzetih 76 vzorcev bolnic z diagnosticiranim rakom dojke v različnih stadijih bolezni. Vzorci so bili odvzeti pred zdravljenjem, v epruveto s separacijskim gelom za vakuumski odvzem krvi.

Po odvzemu in transportu vzorcev v laboratorij smo epruvete centrifugirali 10 min pri 4000 obratih/min. Med centrifugiranjem se je pregrada iz gela premaknila med serum in krvni strdek. Serum smo nato razdelili na tri alikvote in jih shranili pri  $-20^{\circ}\text{C}$ . Pred analiziranjem vzorcev smo serum odtalili, ga primerno redčili in krioviale označili s črtnimi kodami.

### **3.2. CA 15-3**

#### **3.2.1. Princip metode**

Kemiluminiscenca je pojav emisije svetlobe ob kemijski reakciji. Pri eksotermni reakciji molekule prehajajo v vzbujeno stanje, do emisije svetlobe pa prihaja ob prehajanju molekul nazaj v osnovno stanje (13). Koncentracijo CA 15-3 smo izmerili na aparatu DiaSorin LIAISON® XL z metodo direktne kemiluminiscenčne imunološke določitve. Med prvo fazo inkubacije se CA 15-3 veže na prvo monoklonsko protitelo na trdnem nosilcu. Po spiranju se med drugo inkubacijo na vezan CA 15-3 veže drugo monoklonsko protitelo označeno z izoluminolom. Dodan je začetni reagent in sproži se

kemiluminiscenčna reakcija. Svetlobna emisija se meri s fotopomnoževalko in je sorazmerna količini CA 15-3 v vzorcih, kalibraciji ali kontroli (14).

### 3.2.2. Reagenti

Količina in sestava posameznih reagentov v reagenčnem integralu za določitev CA 15-3 z aparatom DiaSorin LIAISON® XL je predstavljena v preglednici II. Reagenčni integral vsebuje 100 testov (14).

Preglednica II: Sestava reagenčnega integrala za določitev CA 15-3 z aparatom DiaSorin LIAISON® XL (14).

ime reagenta	količina (mL)	sestava
magnetni delci	2,3	magnetni delci, prekriti z mišjimi monoklonskimi protitelesi, goveji serumski albumin (BSA), 0,09 % NaN <sub>3</sub>
pufar A	28,0	mišja protitelesa IgG, BSA, 0,09 % NaN <sub>3</sub>
razredčilni pufar	28,0	mišja protitelesa IgG, BSA, 0,09 % NaN <sub>3</sub>
konjugat	11,5	monoklonska mišja protitelesa označena z izoluminolom, BSA, 0,09 % NaN <sub>3</sub>
kalibrator 1	1,0	CA 15-3, BSA, 0,09 % NaN <sub>3</sub>
kalibrator 2	1,0	CA 15-3, BSA, 0,09 % NaN <sub>3</sub>

### 3.2.3. Postopek meritve

Meritve koncentracije CA 15-3 na aparatu DiaSorin LIAISON® XL sledi naslednjim korakom:

1. Pipetiranje magnetnih delcev in razredčilnega pufra v reakcijsko kivetovo.
2. Pipetiranje vzorca, kalibratorja ali kontrole.
3. Inkubacija.
4. Spiranje z Wash/System tekočino.
5. Pipetiranje konjugata v reakcijsko kivetovo.
6. Inkubacija.
7. Spiranje z Wash/System tekočino.
8. Dodatek začetnega reagenta in meritve oddane svetlobe.



Kalibracijo aparata se izvaja v trojniku in je zahtevana kadar:

- uporabimo novo serijo reagenčnega integrala ali začetnega reagenta,
- je bila prejšnja kalibracija izvedena pred več kot 28 dnevi,
- je bil aparat servisiran,
- se vrednosti kontrole nahajajo izven predvidenih vrednosti.

Vrednosti kontrole morajo ležati znotraj pričakovanih vrednosti, da so rezultati meritev veljavni. V nasprotnem primeru je potrebno ponoviti kalibracijo in ponovno testirati kontrole. Kontrola kakovosti naj bi bila izvedena:

- vsaj enkrat dnevno ob uporabi analizatorja,
- ob uporabi novega reagenčnega integrala ali startnih reagentov,
- ob kalibraciji,
- za zagotovitev ustreznosti integrala, če je le ta odprt že več kot 4 tedne.

S testom LIAISON® CA 15-3® je mogoče določati vrednosti do 1000 U/mL (14).

### **3.3. Aktivnost timidin kinaze**

#### **3.3.1. Princip metode**

Aktivnost TK smo izmerili na aparatu DiaSorin LIAISON® XL, ki je prikazan na sliki 3.1. Metoda določanja je indirektna kompetitivna kemiluminiscenca v dveh korakih. Princip kemiluminiscence je opisan v poglavju 3.2.1. Določitev TK je možna v človeškem serumu ali plazmi z dodano EDTA. Med določitvijo TK pretvori 3'-azido-3'-deoksitimidin (AZT) v 3'-azido-3'-deoksitimidin monofosfat (AZTMP). Količina nastalega AZTMP korelira s količino TK v vzorcu. V prvem koraku inkubiramo vzorec s pufrom 1, pufrom 2 in magnetnimi delci. V tem času se AZTMP veže na trdni nosilec. Nato dodamo konjugat z označevalcem, ki med drugo inkubacijo tekmuje za vezavna mesta z AZTMP v raztopini. Po spiranju nevezanega materiala dodamo startni reagent in poteče kemiluminiscenčna reakcija. Svetlobni signal je merjen s fotopomnoževalko in je obratno sorazmeren s količino TK v vzorcu, kalibraciji ali kontroli (15).



Slika 3.1: Analizator DiaSorin LIAISON® XL (16).

### 3.3.2. Reagenti

Reagenčni integral za določitev aktivnosti TK z aparatom DiaSorin LIAISON® XL vsebuje 100 testov z reagenti, navedenimi v preglednici III (15).

Preglednica III: Reagenti za določitev aktivnosti TK z aparatom DiaSorin LIAISON® XL (15).

ime reagenta	količina [mL]	sestava
magnetni delci	2,5	magnetni delci, prekriti s kunčjimi in kozjimi protitelesi, pufer, 0,1 % BSA, 0,09 % NaN <sub>3</sub> , pH=7,4
konjugat	12	derivat izoluminola v pufru, 0,2 % BSA, 0,09 % NaN <sub>3</sub> , pH=7,4
pufer 1	12	pufer s kofaktorji in kunčjimi ter zajčjimi protitelesi, pH=7,4, 0,1 % ProClin® 300
pufer 2	2,5	pufer, pH=4,5
kalibrator 1	liofiliziran, rekonstituirati z 1 mL deionizirane vode	človeški serum, 0,09 % NaN <sub>3</sub> , TK
kalibrator 2	liofiliziran, rekonstituirati z 1 mL deionizirane vode	človeški serum, 0,09 % NaN <sub>3</sub> , TK

### 3.3.3. Postopek meritve

Meritev aktivnosti TK na aparatu DiaSorin LIAISON® XL sledi naslednjim korakom:

1. Pipetiranje pufra 2 in magnetnih delcev v reakcijski modul.
2. Pipetiranje 50 µL vzorca, kalibratorja ali kontrole v reakcijski modul.
3. Pipetiranje pufra 1 v reakcijski modul.
4. Inkubacija 40 min.
5. Pipetiranje konjugata v reakcijski modul.
6. Inkubacija 20 min.
7. Spiranje z Wash/System raztopino.
8. Dodatek začetnega reagenta in meritev oddane svetlobe.

Kalibracijo aparata se izvaja v trojniku in jo je potrebno izvesti kadar:

- je bila prejšnja izvedena pred več kot 14 dnevi,
- je bilo izvedeno servisiranje aparata,
- začnemo uporabljati novo serijo reagentov,
- so rezultati kontrole kakovosti izven sprejemljivega območja.

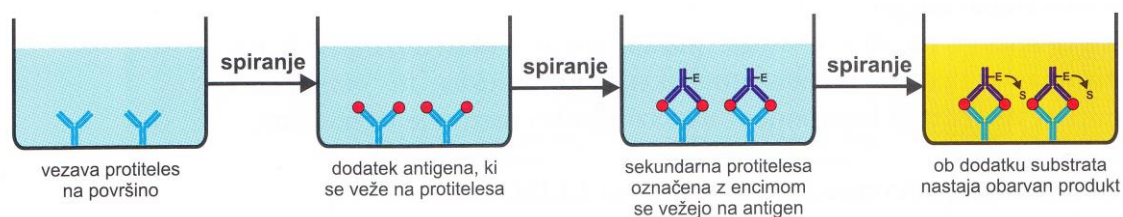
Kontrolo kakovosti se priporoča izvesti vsaj enkrat dnevno. Če vrednosti kontrole ležijo znotraj pričakovanih vrednosti, so meritve vzorcev veljavne, drugače ne in je potrebna ponovna kalibracija in ponovno testiranje kontrole. Meritveno območje za merjenje TK z DiaSorin LIAISON® XL je med 0,5 U/L in 100 U/L (15).

## 3.4. Koncentracija timidin kinaze

### 3.4.1. Princip metode

Imunoencimski test na trdni podlagi (ELISA) se uporablja za dokazovanje antigena ali protiteles v vzorcu, ob uporabi standarda in umeritvene krivulje pa je primerna tudi za določanje koncentracije antigena ali protiteles. Pri direktni ELISI s specifičnim protitelesom prekrijemo površino mikrotitrne plošče, nato dodamo naš vzorec, ki vsebuje antigen in se bo vezal na specifično protitelo. Dodamo sekundarno protitelo, ki ga detektiramo s konjugatom antisekundarno protitelo, na katerega je vezan encim. Encim povzroči nastanek kromogenega, luminiscenčnega ali fluorogenega produkta. Je visoko

specifična in občutljiva metoda, antigen pa mora vsebovati več ustrezno ločenih epitopov (17). Postopek direktne ELISE je prikazan na sliki 3.2.



Slika 3.2: Postopek direktne ELISE (17).

Za merjenje koncentracije TK v serumu bolnic je bil uporabljen TK 210 ELISA test. Meritev je bila opravljena na Švedski univerzi za agrikulturne znanosti v Uppsali na Švedskem (18).

### 3.4.2. Reagenti

Reagenti, uporabljeni pri direktni TK 210 ELISI so prikazani v preglednici IV (18). Količine, ki v preglednici niso navedene, so variabilne v iskanju optimalnih razmerij.

Preglednica IV: Reagenti, uporabljeni pri direktni TK 210 ELISI (18).

reagent	količina [ $\mu\text{L}$ ]
razredčitveni pufer	
spiralni pufer Tecan Hydroflex	
proti-TK protitelo označeno z biotinom	100
streptavidin-hrenova peroksidaza	100
2M HCl	

### 3.4.3. Postopek meritve

Vzorci, kontrole in kalibracije so bili inkubirani 1 uro z razredčilnim pufrom. Mikrotitrna ploščica s 96-imi vdolbinami, ki jih je prekrivalo protitelo, je bila pred nanosom štirikrat sprana s spiralnim pufrom Tecan Hydroflex. Nato je bilo v vsako vdolbino mikrotitrne ploščice dodanih 100  $\mu\text{L}$  vzorca, kontrole in kalibracije ter inkubirano 2 uri na stresalniku. Nevezane molekule so bile sprane s spiralnim pufrom štirikrat po 2 minuti. Nato je bilo

dodanih 100  $\mu\text{L}$  protitelesa proti TK označenega z biotinom in inkubirano 1 uro, nato pa ponovno štirikrat sprano s spiralnim pufrom. Dodano je bilo 100  $\mu\text{L}$  streptavidin – hrenove peroksidaze za 30 minut in sledilo štirikratno spiranje nevezanih molekul. Reakcija je bila ustavljena z dodatkom 2M HCl. Absorbanca je bila pomerjena pri 450 nm, koncentracija TK pa določena iz umeritvene krivulje in programa 4-PL curve fit. Vsa merjenja z vzorci so bila narejena v dvojniku (18).

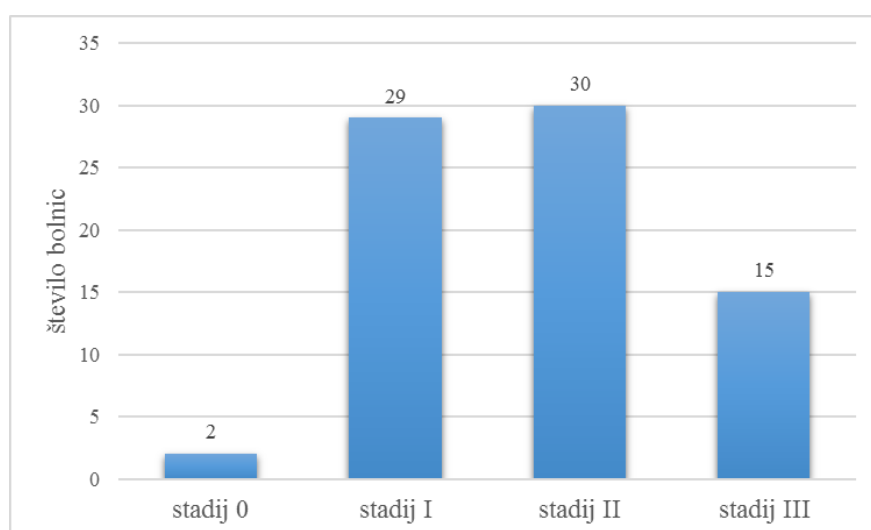
### **3.5. Statistična obdelava**

Statistične analize smo opravili v programu IBM SPSS Statistics 22 in Microsoft Office Excel. Iz meritev smo najprej izračunali kvocient med aktivnostjo TK in koncentracijo TK. Porazdelitev kontrolnih skupin, aktivnosti TK, koncentracije TK, kvocienta aktivnosti in koncentracije TK ter CA 15-3 smo testirali na normalnost porazdelitve. Uporabili smo Shapiro-Wilk test in ugotovili, da se ne porazdeljujejo po Gaussovi krivulji. Nato smo uporabili neparametrični Mann–Whitneyev test za dokazovanje statistično pomembne razlike povprečne vrednosti med posameznimi tumorskimi označevalci pri skupini bolnic in kontrolni skupini in med posameznimi stadiji raka dojke. Stopnja tveganja je bila določena na 0,05. Skonstruirali smo tudi ROC krivulje in tako ocenili diagnostično uporabnost posameznega tumorskega označevalca. Po enačbah, predstavljenih v preglednici I, smo izračunali specifičnost in občutljivost tumorskih označevalcev. Ker se naše meritve ne porazdeljujejo po Gaussovi krivulji, smo za računanje korelacij med posameznimi tumorskimi označevalci uporabili Spearmanov koeficient korelacije.

## 4. Rezultati

### 4.1. Vzorci

Analizirali smo 76 vzorcev seruma žensk z rakom dojke. Vzorci so bili odvzeti ob diagnostiki žensk z boleznijo. Razdelili smo jih glede na TNM stadij raka dojke. Stadij 0 raka dojke imata 2 bolnici, stadij I ima 28 bolnic, 31 bolnic ima raka dojke v stadiju II, v stadiju III pa ima raka dojke 15 bolnic. Vzorcev bolnic z rakom dojke v stadiju IV v študiji nimamo vključenih. Vzorce smo glede na stadij razdelili v dve skupini. V prvi skupini imamo vzorce žensk z začetnim stadijem raka dojke. Sem prištevamo stadije 0, I in II. V tej skupini se nahaja 61 vzorcev bolnic. V drugi skupini imamo vzorce žensk s poznim stadijem, kamor sodi stadij III raka dojke. Vzorcev v tej skupini je 15. Na sliki 4.1 je prikazana razporeditev bolnic glede na stadij raka dojke.



Slika 4.1: Razporeditev bolnic glede na stadij raka dojke.

Povprečna starost bolnic, vključenih v študijo, je 57 let. V kontrolno skupino za aktivnost TK, koncentracijo TK in kvocientom med njima je vključenih 52 zdravih žensk. Povprečna starost je 42 let. V kontrolno skupino za CA 15-3 je vključenih 94 zdravih žensk s povprečno starostjo 61 let. Rezultati vseh meritev vzorcev bolnic in kontrolnih skupin so prikazani v poglavju 8.

## 4.2. CA 15-3

Referenčna vrednost za tumorski označevalec CA 15-3 je do 30 U/mL. Za določevanje statistično pomembne razlike med povprečno vrednostjo skupine bolnic in kontrolne skupine smo uporabili Mann-Whitneyev test. Postavili smo naslednji hipotezi:

Ho: Povprečni vrednosti obeh skupin izhajata iz iste populacije.

Ha: Povprečni vrednosti skupin izhajata iz različnih populacij.

V preglednici V so prikazani rezultati Mann-Whitneyevega testa.

Preglednica V: Rezultati Mann-Whitneyevega testa za CA 15-3.

	<b>povprečni rang</b>	<b>vsota rangov</b>	<b>Mann Whitney U</b>	<b>Z vrednost</b>	<b>P vrednost</b>
<b>kontrolna skupina</b>	80,23	7542,00	3077,00	-1,552	0,121
<b>skupina bolnic</b>	92,01	6993,00			

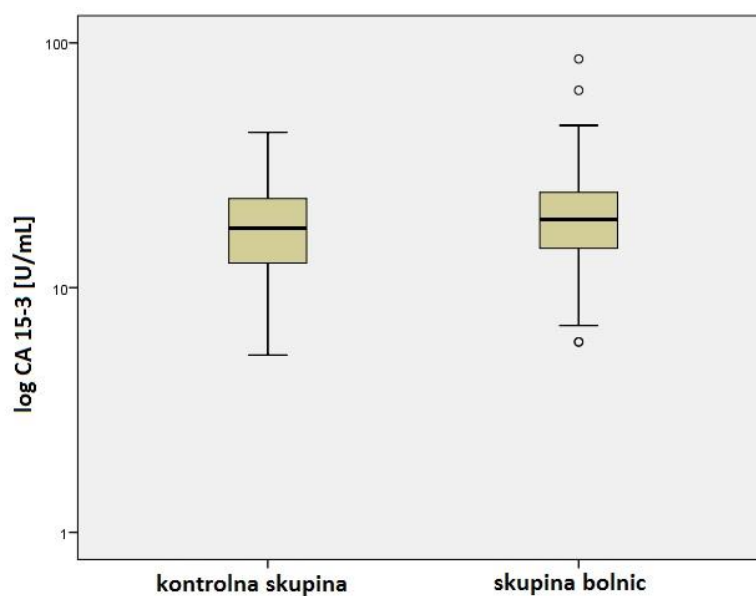
Ker je p-vrednost večja od 0,05, ničelne hipoteze ne moremo zavrniti. Iz tega sledi, da povprečni vrednosti med skupinama izhajata iz iste populacije in se statistično pomembno ne razlikujeta.

Pri rezultatih za CA 15-3 smo pri obeh skupinah vzorcev opravili tudi deskriptivno statistično analizo. Izračunani parametri skupaj z občutljivostjo in specifičnostjo so prikazani v preglednici VI.

Preglednica VI: Parametri statistične analize ter občutljivost in specifičnost CA 15-3 pri bolnicah in kontrolni skupini.

	<b>skupina bolnic</b>	<b>kontrolna skupina</b>
<b>povišane vrednosti</b>	14 vzorcev (18,4 %)	5 vzorcev (5,3 %)
<b>najnižja vrednost (MIN)</b>	6 U/mL	5 U/mL
<b>najvišja vrednost (MAX)</b>	86 U/mL	43 U/mL
<b>povprečna vrednost (PV)</b>	22 U/mL	18 U/mL
<b>standardni odklon (SD)</b>	13 U/mL	7 U/mL
<b>interkvartilni razmik (IQR)</b>	11 U/mL	11 U/mL
<b>občutljivost</b>	18,4 %	/
<b>specifičnost</b>	94,7 %	/

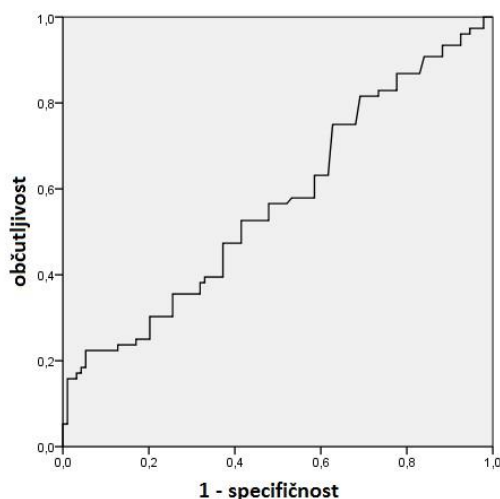
Na sliki 4.2 so prikazane izmerjene vrednosti CA 15-3 pri bolnicah v primerjavi s kontrolno skupino.



Slika 4.2: Vrednosti CA 15-3 pri bolnicah v primerjavi s kontrolno skupino.

Za CA 15-3 pri skupini bolnic smo skonstruirali ROC krivuljo, katere površina pod krivuljo meri 0,569. Prikazana je na sliki 4.3





Slika 4.3: ROC krivulja za CA 15-3.

Skupino smo razdelili na dve manjši, glede na stadij raka dojke. Za določevanje statistično pomembnih razlik med povprečnimi vrednostmi kontrolne skupine, skupine začetnih stadijev in skupine poznih stadijev raka dojke smo uporabili Mann-Whitneyev test. Rezultati so prikazani v preglednici VII. Postavili smo hipotezi:

Ho: Povprečni vrednosti obeh skupin izhajata iz iste populacije.

Ha: Povprečni vrednosti skupin izhajata iz različnih populacij.

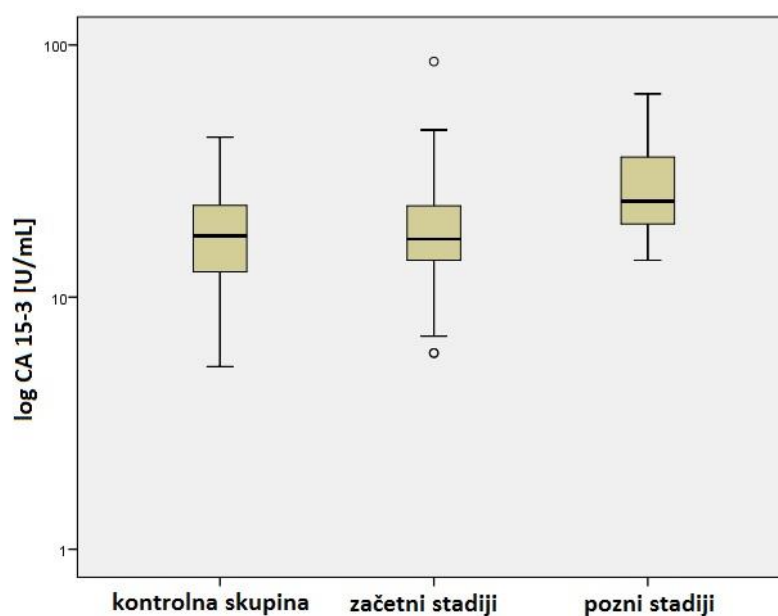
Preglednica VII: Rezultati Mann-Whitneyevega testa za CA 15-3 pri začetnih in poznih stadijih raka dojke in kontrolni skupini.

	<b>povprečni rang</b>	<b>vsota rangov</b>	<b>Mann Whitney U</b>	<b>Z vrednost</b>	<b>P vrednost</b>
<b>kontrolna skupina</b>	76,68	7208,00	2743,00	-0,454	0,650
<b>začetni stadiji</b>	80,03	4882,00			
<b>kontrolna skupina</b>	51,05	4799,00	334,00	-3,263	0,001
<b>pozni stadiji</b>	79,73	1196,00			
<b>začetni stadiji</b>	35,08	2140,00	249,00	-2,726	0,006
<b>pozni stadiji</b>	52,40	786,00			

Med meritvami kontrolne skupine in poznimi stadiji raka dojke ter med začetnimi in poznimi stadiji raka dojke obstaja statistično pomembna razlika, saj je p vrednost manjša od 0,05. Med meritvami kontrolne skupine in začetnimi stadiji te razlike ni, saj je p vrednost večja od 0,05. Izračunali smo parametre deskriptivne statistične analize ter občutljivost in specifičnost za skupino začetnih stadijev in skupino poznih stadijev raka dojke v primerjavi s kontrolno skupino. Rezultati so prikazani v preglednici VIII. Meritve CA 15-3 glede na stadij raka dojke so prikazane na sliki 4.4.

Preglednica VIII: Parametri deskriptivne statistične analize ter občutljivost in specifičnost CA 15-3 pri skupini začetnih stadijev in skupini poznih stadijev raka dojke v primerjavi s kontrolno skupino.

	<b>začetni stadiji</b>	<b>pozni stadiji</b>	<b>kontrolna skupina</b>
<b>povišane vrednosti</b>	8 vzorcev (13,1 %)	6 vzorcev (40,0 %)	5 vzorcev (5,3 %)
<b>MIN</b>	6 U/mL	14 U/mL	5 U/mL
<b>MAX</b>	86 U/mL	64 U/mL	43 U/mL
<b>PV</b>	20 U/mL	29 U/mL	18 U/mL
<b>SD</b>	12 U/mL	14 U/mL	7 U/mL
<b>IQR</b>	10 U/mL	19 U/mL	11 U/mL
<b>občutljivost</b>	13,1 %	40,0 %	/
<b>specifičnost</b>	94,7 %	94,7 %	/



Slika 4.4: Meritve CA 15-3 glede na stadij raka dojke v primerjavi s kontrolno skupino.

### 4.3. Aktivnost TK

Referenčna vrednost za aktivnost TK v serumu znaša do 8 U/L. Uporabili smo Mann-Whitneyev test za določanje statistično pomembne razlike med povprečno vrednostjo aktivnosti TK pri kontrolni skupini in skupini bolnic. Rezultati so prikazani v preglednici IX. Postavili smo hipotezi:

Ho: Povprečni vrednosti obeh skupin izhajata iz iste populacije.

Ha: Povprečni vrednosti skupin izhajata iz različnih populacij.

Preglednica IX: Rezultati Mann-Whitneyevega testa za aktivnost TK.

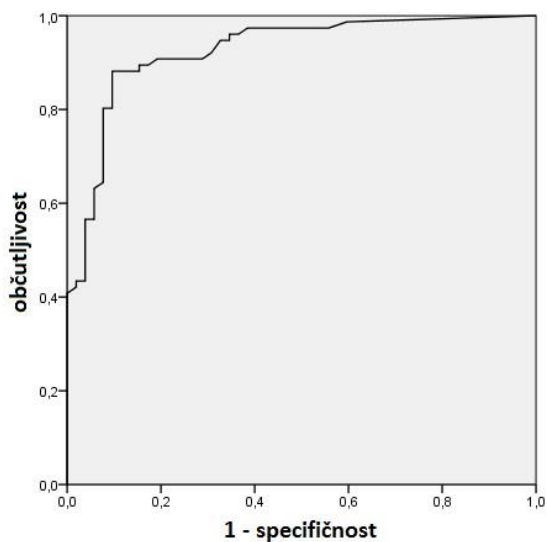
	<b>povprečni rang</b>	<b>vsota rangov</b>	<b>Mann Whitney U</b>	<b>Z vrednost</b>	<b>p vrednost</b>
<b>kontrolna skupina</b>	32,12	1671,00	293,00	-8,186	0,000
<b>skupina bolnic</b>	86,64	6585,00			

Ker je p vrednost manjša od 0,05 lahko ničelno hipotezo zavrnemo in sprejmemo alternativno. Povprečne vrednosti med skupinama se statistično pomembno razlikujeta ena od druge. Izvedli smo tudi deskriptivno statistično analizo pri obeh skupinah ter izračunali še občutljivost in specifičnost. Rezultati so prikazani v preglednici X.

Preglednica X: Rezultati deskriptivne analize in občutljivosti ter specifičnosti aktivnosti TK pri bolnicah in kontrolni skupini.

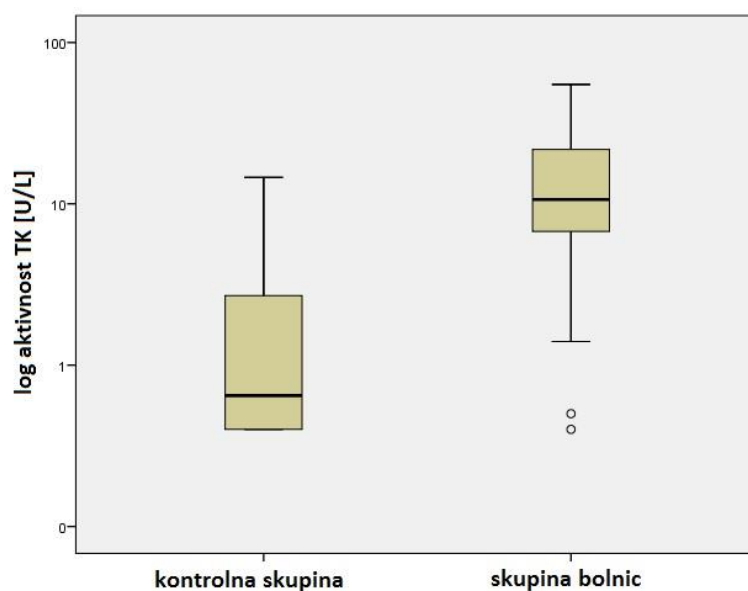
	<b>skupina bolnic</b>	<b>kontrolna skupina</b>
<b>povišane vrednosti</b>	49 vzorcev (64,5 %)	6 vzorcev (11,5 %)
<b>MIN</b>	0,4 U/L	0,4 U/L
<b>MAX</b>	55,0 U/L	14,6 U/L
<b>PV</b>	15,5 U/L	2,2 U/L
<b>SD</b>	12,4 U/L	3,1 U/L
<b>IQR</b>	15,3 U/L	2,3 U/L
<b>občutljivost</b>	64,5 %	/
<b>specifičnost</b>	88,5 %	/

Na sliki 4.5 je prikazana ROC krivulja za aktivnost TK. Površina pod krivuljo je 0,926.



Slika 4.5: ROC krivulja za aktivnost TK.

Meritve aktivnosti TK pri bolnicah v primerjavi s kontrolno skupino so prikazane na sliki 4.6.



Slika 4.6: Meritve aktivnosti TK pri bolnicah v primerjavi s kontrolno skupino.

Nato smo skupino razdelili še na skupini z začetnimi stadiji in s poznimi stadiji raka dojke. Prav tako smo preverili statistično pomembne razlike v povprečni vrednosti med skupinama in kontrolno skupino. Uporabili smo Mann-Whitneyev test in postavili naslednji hipotezi:

Ho: Povprečni vrednosti obeh skupin izhajata iz iste populacije.

Ha: Povprečni vrednosti skupin izhajata iz različnih populacij.

Rezultati so prikazani v preglednici XI.

Preglednica XI: Rezultati Mann-Whitneyevega testa za aktivnost TK pri začetnih in poznih stadijih in kontrolni skupini.

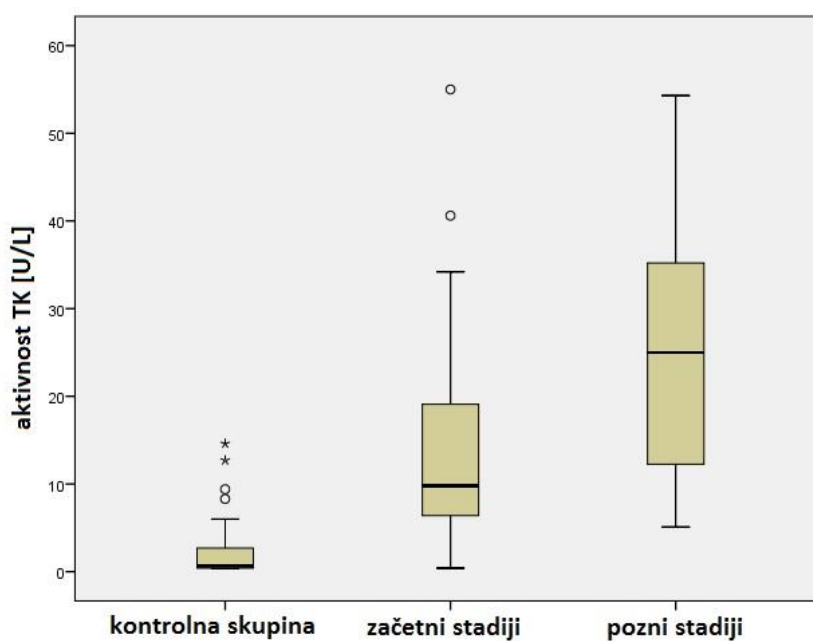
	<b>povprečni rang</b>	<b>vsota rangov</b>	<b>Mann Whitney U</b>	<b>Z vrednost</b>	<b>p vrednost</b>
<b>kontrolna skupina</b>	31,83	1655,00	277,00	-7,569	0,000
<b>začetni stadiji</b>	78,46	4786,00			
<b>kontrolna skupina</b>	26,81	1394,00	16,00	-5,715	0,000
<b>pozni stadiji</b>	58,93	884,00			
<b>začetni stadiji</b>	35,07	2139,00	248,00	-2,734	0,006
<b>pozni stadiji</b>	52,47	787,00			

Vse p vrednosti so manjše od stopnje tveganja 0,05, kar pomeni, da lahko zavrnamo ničelno hipotezo in sprejmemo alternativno. Povprečne vrednosti vseh skupin izhajajo iz različnih populacij in se statistično pomembno razlikujejo.

Izračunali smo tudi parametre deskriptivne statistične analize in občutljivost ter specifičnost aktivnosti TK pri skupinama začetnih in poznih stadijev raka dojke ter pri kontrolni skupini. Prikazani so v preglednici XII. Meritve aktivnosti TK, razdeljene glede na stadij raka dojke v primerjavi s kontrolno skupino, so prikazane na sliki 4.7.

Preglednica XII: Parametri deksriptivne analize in občutljivost ter specifičnost aktivnosti TK glede na stadij raka dojke v primerjavi s kontrolno skupino.

	<b>začetni stadiji</b>	<b>pozni stadiji</b>	<b>kontrolna skupina</b>
<b>povišane vrednosti</b>	37 vzorcev (60,7 %)	12 vzorcev (80,0 %)	6 vzorcev (11,5 %)
<b>MIN</b>	0,4 U/L	5,1 U/L	0,4 U/L
<b>MAX</b>	55,0 U/L	54,3 U/L	14,6 U/L
<b>PV</b>	13,4 U/L	24,2 U/L	2,2 U/L
<b>SD</b>	10,9 U/L	14,4 U/L	3,1 U/L
<b>IQR</b>	12,8 U/L	27,5 U/L	2,3 U/L
<b>občutljivost</b>	60,7 %	80,0 %	/
<b>specifičnost</b>	88,5 %	88,5 %	/



Slika 4.7: Meritve aktivnosti TK pri začetnih in poznih stadijih raka dojke v primerjavi s kontrolno skupino.

## 4.4. Koncentracija TK

Referenčno vrednost za koncentracijo TK v serumu smo določili iz kontrolne skupine in znaša 0,253 ng/mL. Z Mann-Whitneyevim testom smo želeli dokazati statistično pomembno razliko v povprečni vrednosti koncentracije TK med kontrolno skupino in skupino bolnic. Rezultati so prikazani v preglednici XIII. Postavili smo naslednji hipotezi:

Ho: Povprečni vrednosti obeh skupin izhajata iz istih populacij.

Ha: Povprečni vrednosti skupin izhajata iz različnih populacij.

Preglednica XIII: Rezultati Mann-Whitneyevega testa za koncentracijo TK.

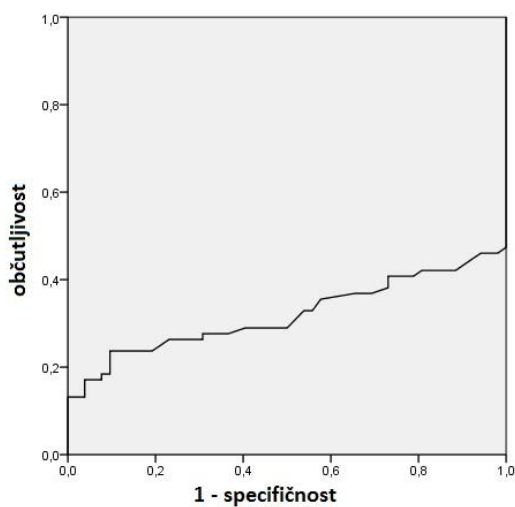
	<b>povprečni rang</b>	<b>vsota rangov</b>	<b>Mann Whitney U</b>	<b>Z vrednost</b>	<b>p vrednost</b>
<b>kontrolna skupina</b>	78,20	4066,50	1263,50	-3,461	0,001
<b>skupina bolnic</b>	55,13	4189,50			

Ker je p vrednost manjša od 0,05 lahko zavrnemo ničelno hipotezo in sprejmemo alternativno. Med povprečno vrednostjo skupine bolnic in povprečno vrednostjo kontrolne skupine obstaja statistično pomembna razlika. Izvedli smo tudi deskriptivno statistično analizo za meritve koncentracije TK ter izračunali občutljivost in specifičnost. Rezultati so navedeni v preglednici XIV.

Preglednica XIV: Rezultati deskriptivne analize z občutljivostjo in specifičnostjo za koncentracijo TK pri bolnicah in kontrolni skupini.

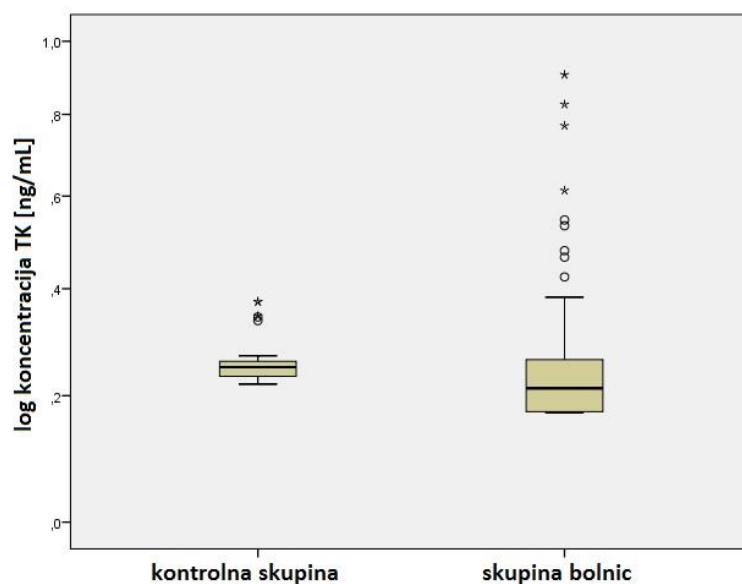
	<b>skupina bolnic</b>	<b>kontrolna skupina</b>
<b>povišane vrednosti</b>	22 vzorcev (28,9 %)	24 vzorcev (46,2 %)
<b>MIN</b>	0,171 ng/mL	0,220 ng/mL
<b>MAX</b>	0,906 ng/mL	0,374 ng/mL
<b>PV</b>	0,266 ng/mL	0,257 ng/mL
<b>SD</b>	0,151 ng/mL	0,035 ng/mL
<b>IQR</b>	0,092 ng/mL	0,028 ng/mL
<b>občutljivost</b>	28,9 %	/
<b>specifičnost</b>	53,8 %	/

Pri skupini vseh bolnic smo za koncentracijo TK skonstruirali ROC krivuljo, ki je prikazana na sliki 4.8. Površina pod krivuljo meri 0,320.



Slika 4.8: ROC krivulja za koncentracijo TK.

Na sliki 4.9 so prikazane meritve koncentracije TK pri bolnicah v primerjavi s kontrolno skupino.



Slika 4.9: Meritve koncentracije TK pri bolnicah v primerjavi s kontrolno skupino.



Z Mann-Whitneyevim testom smo želeli dokazati statistično pomembno razliko tudi med povprečnimi vrednostmi skupin z začetnimi in poznimi stadiji raka dojke ter kontrolno skupino. Postavili smo hipotezi:

Ho: Povprečni vrednosti obeh skupin izhajata iz iste populacije.

Ha: Povprečni vrednosti izhajata iz različnih populacij.

Rezultati so prikazani v preglednici XV.

Preglednica XV: Rezultati Mann-Whitneyevega testa za koncentracijo TK med skupinama začetnih in poznih stadijev ter kontrolne skupine.

	<b>povprečni rang</b>	<b>vsota rangov</b>	<b>Mann Whitney U</b>	<b>Z vrednost</b>	<b>p vrednost</b>
<b>kontrolna skupina</b>	68,60	3567,00	983,00	-3,477	0,001
<b>začetni stadiji</b>	47,11	2874,00			
<b>kontrolna skupina</b>	36,11	1877,50	280,50	-1,648	0,099
<b>pozni stadiji</b>	26,70	400,50			
<b>začetni stadiji</b>	38,61	2355,50	450,50	-0,092	0,927
<b>pozni stadiji</b>	38,03	570,50			

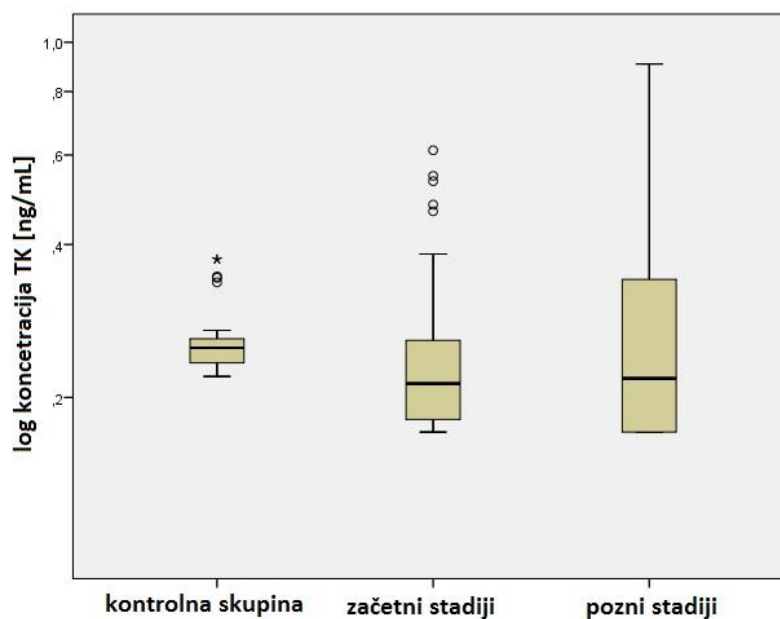
Glede na to da je samo p vrednost med skupinama začetnih stadijev in kontrolno skupino manjša od 0,05, lahko ugotovimo, da je statistično pomembna razlika med povprečnima vrednostima samo pri teh dveh skupinah. Pri ostalih primerjavah je p vrednost večja od stopnje tveganja in ničelne hipoteze ne moremo zavrniti, povprečne vrednosti torej izhajajo iz iste populacije.

Na meritvah koncentracije TK pri začetnih in poznih stadijih raka dojke smo naredili tudi deskriptivno statistično analizo ter izračunali občutljivost in specifičnost tumorskega označevalca. Rezultate smo primerjali s kontrolno skupino in so prikazani v preglednici XVI.

Preglednica XVI: Parametri deskriptivne statistične analize z izračuni občutljivosti in specifičnosti koncentracije TK pri začetnih in poznih stadijih ter kontrolni skupini.

	<b>začetni stadiji</b>	<b>pozni stadiji</b>	<b>kontrolna skupina</b>
<b>povišane vrednosti</b>	17 vzorcev (27,9 %)	5 vzorcev (33,3 %)	24 vzorcev (46,2 %)
<b>MIN</b>	0,171 ng/mL	0,171 ng/mL	0,220 ng/mL
<b>MAX</b>	0,613 ng/mL	0,906 ng/mL	0,374 ng/mL
<b>PV</b>	0,248 ng/mL	0,340 ng/mL	0,257 ng/mL
<b>SD</b>	0,101 ng/mL	0,265 ng/mL	0,035 ng/mL
<b>IQR</b>	0,084 ng/mL	0,253 ng/mL	0,028 ng/mL
<b>občutljivost</b>	27,9 %	33,3 %	/
<b>specifičnost</b>	53,8 %	53,8 %	/

Meritve koncentracije TK pri začetnih stadijih in poznih stadijih raka dojke v primerjavi s kontrolno skupino so prikazani na sliki 4.10.



Slika 4.10: Meritve koncentracije TK pri začetnih in poznih stadijih raka dojke ter kontrolni skupini.

## 4.5. Kvocient aktivnost TK/koncentracija TK

Referenčno vrednost smo določili iz kontrolne skupine na 0,006 U/ng. Statistično pomembno razliko med povprečno vrednostjo skupine bolnic in kontrolne skupine smo želeli dokazati z Mann-Whitneyevim testom. Postavili smo naslednji hipotezi:

Ho: Povprečni vrednosti obeh skupin izhajata iz iste populacije.

Ha: Povprečni vrednosti skupin izhajata iz različnih populacij.

Rezultati so prikazani v preglednici XVII.

Preglednica XVII: Rezultati Mann-Whitneyevega testa za kvocient aktivnost TK/koncentracija TK.

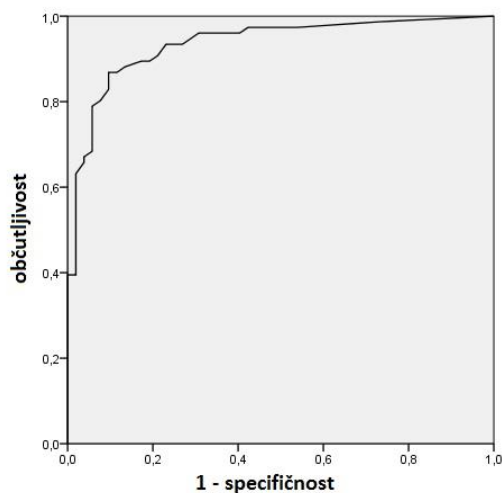
	<b>povprečni rang</b>	<b>vsota rangov</b>	<b>Mann Whitney U</b>	<b>Z vrednost</b>	<b>p vrednost</b>
<b>kontrolna skupina</b>	31,39	1632,50	254,50	-8,362	0,000
<b>skupina bolnic</b>	87,15	6623,50			

Ker je p vrednost manjša od 0,05, lahko privzamemo, da povprečne vrednosti kontrolne skupine in skupine bolnic izhajata iz različnih populacij. Naredili smo tudi deskriptivno statistično analizo in izračunali občutljivost in specifičnost kvocienta. Rezultati so prikazani v preglednici XVIII.

Preglednica XVIII: Rezultati deskriptivne analize in izračun občutljivosti in specifičnosti za kvocient aktivnost TK/koncentracija TK.

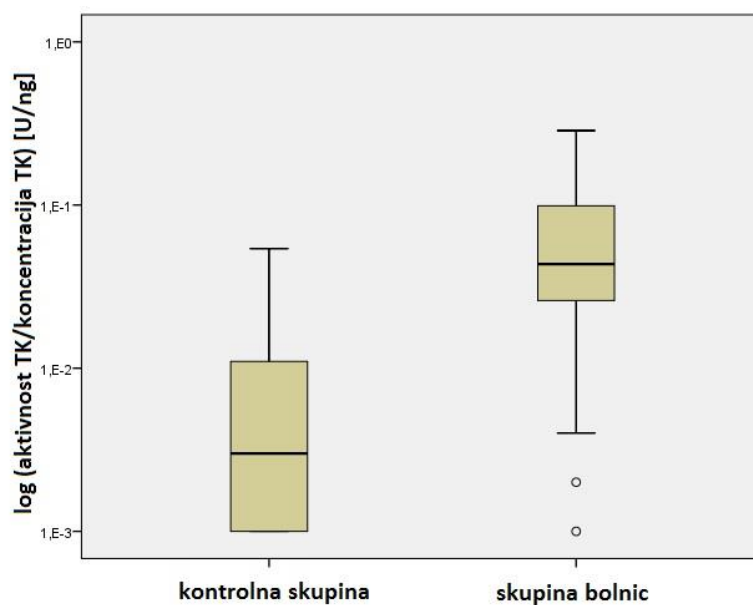
	<b>skupina bolnic</b>	<b>kontrolna skupina</b>
<b>povišane vrednosti</b>	73 vzorcev (96,1 %)	20 vzorcev (38,5 %)
<b>MIN</b>	0,001 U/ng	0,001 U/ng
<b>MAX</b>	0,286 U/ng	0,054 U/ng
<b>PV</b>	0,066 U/ng	0,008 U/ng
<b>SD</b>	0,057 U/ng	0,010 U/ng
<b>IQR</b>	0,074 U/ng	0,010 U/ng
<b>občutljivost</b>	96,1 %	/
<b>specifičnost</b>	61,5 %	/

Izračunali smo tudi ROC krivuljo za kvocient med aktivnostjo TK in koncentracijo TK, ki je prikazana na sliki 4.11. Površina pod krivuljo znaša 0,936.



Slika 4.11: ROC krivulja za kvocient aktivnost TK/koncentracija TK.

Izračuni kvocienta med aktivnostjo in koncentracijo TK pri bolnicah v primerjavi s kontrolno skupino so prikazani na sliki 4.12.



Slika 4.12: Izračunani kvocient med aktivnostjo TK in koncentracijo TK pri bolnicah v primerjavi s kontrolno skupino.

Izračunane kvociente smo razdelili v skupini začetnih stadijev in poznih stadijev raka dojke. Z Mann-Whitneyevim testom smo preverili, ali se povprečne vrednosti posameznih skupin med seboj statistično pomembno razlikujejo ali ne. Postavili smo sledeči hipotezi:

Ho: Povprečni vrednosti obeh skupin izhajata iz iste populacije.

Ha: Povprečni vrednosti skupin izhajata iz različnih populacij.

Rezultati so predstavljeni v preglednici XIX.

Preglednica XIX: Rezultati Mann-Whitneyevega testa za kvocient aktivnost TK/koncentracija TK pri skupinah začetnih in poznih stadijev ter kontrolni skupini.

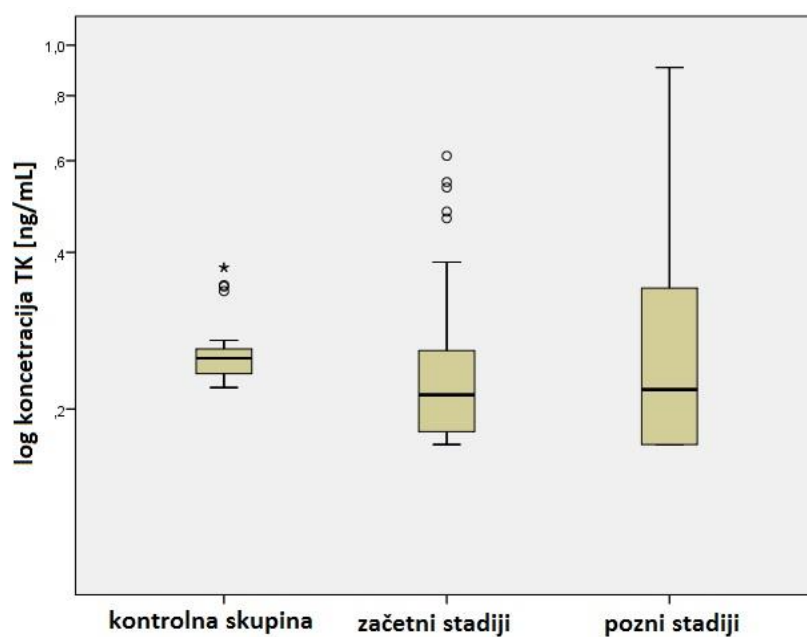
	<b>povprečni rang</b>	<b>vsota rangov</b>	<b>Mann Whitney U</b>	<b>Z vrednost</b>	<b>p vrednost</b>
<b>kontrolna skupina</b>	31,12	1618,00	240,00	-7,768	0,000
<b>začetni stadiji</b>	79,07	4823,00			
<b>kontrolna skupina</b>	26,78	1392,50	14,50	-5,686	0,000
<b>pozni stadiji</b>	59,03	885,50			
<b>začetni stadiji</b>	36,00	2196,00	305,00	-1,991	0,047
<b>pozni stadiji</b>	48,67	730,00			

Glede na to, da so vse p vrednosti manjše od stopnje tveganja 0,05, lahko v vseh treh primerih zavrnilo ničelno hipotezo in sprejmemo alternativno. Kvocienti med aktivnostjo TK in koncentracijo TK imajo v vseh treh skupinah statistično pomembno različne povprečne vrednosti.

Za izračunane kvociente aktivnost TK/koncentracija TK, razdeljenih v dve skupini glede na stadij raka dojke, smo naredili tudi deskriptivno statistično analizo. Izračunali smo tudi občutljivost in specifičnost tumorskega označevalca. Rezultati so navedeni v preglednici XX. Izračunani kvocienti, razdeljeni v skupini začetnih in poznih stadijev, v primerjavi s kontrolno skupino so prikazani na sliki 4.13.

Preglednica XX: Rezultati deskriptivne analize z občutljivostjo in specifičnostjo za kvocient aktivnost TK/koncentracija TK pri začetnih stadijih, poznih stadijih in kontrolni skupini.

	<b>začetni stadiji</b>	<b>pozni stadiji</b>	<b>kontrolna skupina</b>
<b>povišane vrednosti</b>	58 vzorcev (95,1 %)	15 vzorcev (100 %)	20 vzorcev (38,5 %)
<b>MIN</b>	0,001 U/ng	0,021 U/ng	0,001 U/ng
<b>MAX</b>	0,286 U/ng	0,214 U/ng	0,054 U/ng
<b>PV</b>	0,066 U/ng	0,092 U/ng	0,008 U/ng
<b>SD</b>	0,057 U/ng	0,064 U/ng	0,010 U/ng
<b>IQR</b>	0,074 U/ng	0,106 U/ng	0,010 U/ng
<b>občutljivost</b>	95,1 %	100 %	/
<b>specifičnost</b>	61,5 %	61,5 %	/



Slika 4.13: Izračunani kvocienti aktivnost TK/koncentracija TK pri začetnih stadijih, poznih stadijih in kontrolni skupini.

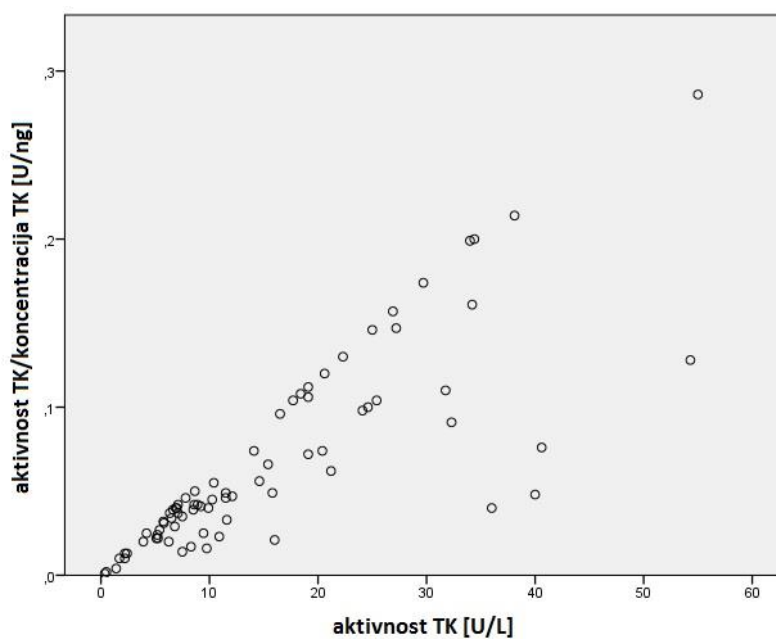
## 4.6. Korelacije med posameznimi tumorskimi označevalci

Da bi ugotovili povezanost med posameznimi tumorskimi označevalci, smo izračunali medsebojne korelacije. Ker se naše meritve ne porazdeljujejo po Gaussovi krivulji, smo uporabili Spearmanov koeficient korelacije. Izračunani koeficienti korelacije so prikazani v preglednici XXI.

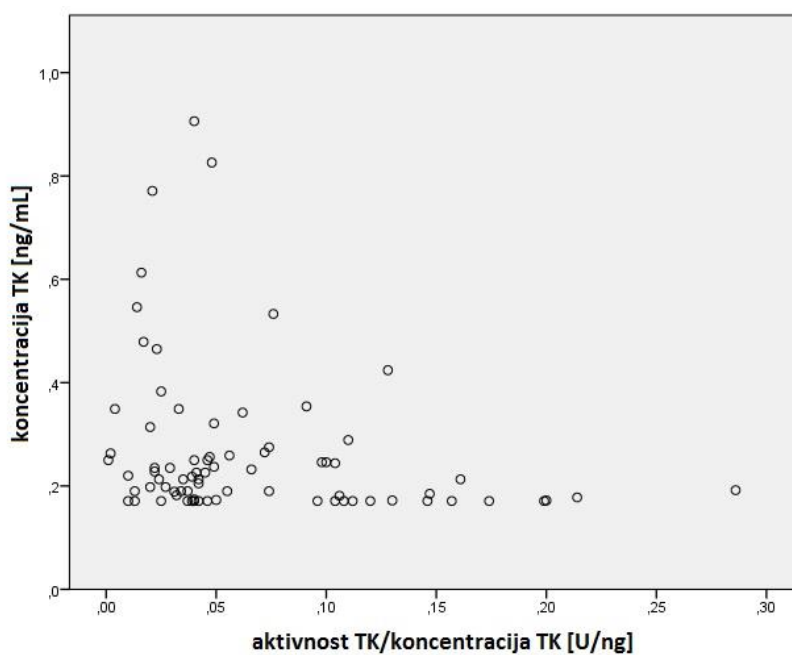
Preglednica XXI: Spearmanovi koeficienti korelacije med posameznimi tumorskimi označevalci.

	CA 15-3	aktivnost TK	koncentracija TK	kvocient aktivnost TK/koncentracija TK
CA 15-3	/	0,093	0,063	0,031
aktivnost TK	0,093	/	0,123	0,872
koncentracija TK	0,063	0,123	/	-0,288
kvocient aktivnost TK/koncentracija TK	0,031	0,872	-0,288	/

Iz Spearmanovih koeficientov korelacije lahko razberemo, da sta prisotni samo dve statistično pomembni korelaciji. Med aktivnostjo TK in kvocientom med aktivnostjo TK in koncentracijo TK je prisotna močna pozitivna korelacija, kar pomeni, da obe spremenljivki skupaj naraščata. Korelacijski diagram med njima je prikazan na sliki 4.14. Druga statistično pomembna korelacija je negativna korelacija med koncentracijo TK in kvocientom med aktivnostjo TK in koncentracijo TK. Negativna korelacija pomeni, da vrednosti ene spremenljivke naraščajo, medtem ko vrednosti druge upadajo. Korelacija je sicer šibka. Korelacijski diagram med koncentracijo TK in kvocientom aktivnost TK/koncentracija TK je prikazan na sliki 4.15.



Slika 4.14: Korelacijski diagram med aktivnostjo TK in kvocientom aktivnost TK/koncentracija TK.



Slika 4.15: Korelacijski diagram med koncentracijo TK in kvocientom aktivnost TK/koncentracijo TK.



## 5. Razprava

Rak dojke je najpogostejša oblika invazivnega raka pri ženskah po svetu. Določanje tumorskih označevalcev v telesnih tekočinah predstavlja pomemben del v diagnostiki raka dojke. Najpogosteje se določa nivo CA 15-3 v serumu. V magistrski nalogi smo želeli prikazati doprinos k laboratorijski diagnostiki raka dojke z meritvami aktivnosti TK, koncentracije TK in njunega kvocienta v serumu. Dosedanje študije kažejo, da bi bila TK lahko uporaben tumorski označevalec pri raku dojke, tako za odkrivanje nove bolezni kot tudi odkrivanje napredovanja bolezni. Meritve in analize smo naredili pri vseh bolnicah skupaj in jih primerjali s kontrolno skupino. Nato smo jih razdelili še v dve skupini glede na stadij raka dojke. V skupini začetnih stadijev imamo 61 bolnic z rakom dojke, v skupini s poznimi stadiji pa 15 bolnic. Veliko število bolnic v začetnih stadijih raka dojke je zaželeno, saj to pomeni, da smo bolezen ujeli že v začetni fazi obolenja.

Meritve CA 15-3 so pokazale, da ima le nekaj vzorcev v začetnem stadiju raka dojke vrednosti povišane nad referenčno vrednostjo, kar kaže na slabo občutljivost tumorskega označevalca v začetnih stadijih bolezni. Občutljivost CA 15-3 pri začetnih stadijih znaša 13,1 %. Iz tega lahko sklepamo, da tumorski označevalec ni najboljši za presejalni test katerega namen je odkrivanje novih bolnic z rakom dojke. Do nekoliko večjega povišanja vrednosti je prišlo šele pri bolnicah s stadijem III raka dojke, kar pa ni najboljšo, saj bi si želeli tumorski označevalec, ki bi bil bolj učinkovit tudi v začetni fazi bolezni. Občutljivost se pri poznih stadijih raka dojke poveča na 42,9 %. CA 15-3 je zato bolj uporaben tumorski označevalec za odkrivanje napredovanja bolezni. Povprečna vrednost iz 20 U/mL pri začetnih stadijih raka dojke naraste na 29 U/mL pri poznih stadijih. Glede na SD in IQR je razpršenost meritev v vseh skupinah podobna. Z Mann-Whitneyevim testom smo dokazali,

da med skupinama začetnih in poznih stadijev raka dojke obstaja statistično pomembna razlika. Ta razlika obstaja tudi med kontrolno skupino in skupino poznih stadijev. Statistično pomembne razlike v povprečnih vrednostih med kontrolno skupino in skupino začetnih stadijev ter kontrolno skupino in skupino vseh bolnic nismo mogli dokazati. Specifičnost za CA 15-3 znaša 94,7 % in nakazuje da je tumorski označevalec zelo specifičen za raka dojke. Izračunali smo tudi občutljivost pri vseh bolnicah skupaj in meri 18,4 %, kar je zelo nizko. Površina pod krivuljo ROC znaša 0,569, kar pomeni slabo diagnostično uporabnost tumorskega označevalca.

Kot uporaben tumorski označevalec pri raku dojke se je v naši raziskavi pokazala aktivnost TK, izmerjena v serumu bolnic. Z Mann-Whitneyevim testom smo dokazali statistično pomembno razliko med povprečnimi vrednostmi meritev v kontrolni skupini in skupini vseh bolnic skupaj, kot tudi razliko med kontrolno skupino in začetnimi stadiji, kontrolno skupino in poznimi stadiji ter med začetnimi in poznimi stadiji raka dojke. Meritve aktivnosti TK naraščajo skladno z naraščanjem stadija bolezni. Povprečna vrednost aktivnosti TK narašča od kontrolne skupine (2,2 U/L), preko skupine začetnih stadijev (13,4 U/L) do skupine poznih stadijev (24,2 U/L) raka dojke. Naraste tudi najnižja izmerjena vrednost, medtem ko sta najvišji izmerjeni vrednosti pri začetnih (55,0 U/L) in poznih stadijih (54,3 U/L) primerljivi. Glede na SD in IQR so meritve pri skupini poznih stadijev raka dojke nekoliko bolj razpršene kot v drugih skupinah. V primerjavi s CA 15-3 se aktivnost TK kaže kot bolj uporaben tumorski označevalec že v začetnih fazah raka dojke in bolj uporaben za odkrivanje novo nastale bolezni. Občutljivost aktivnosti TK že v začetnih stadijih raka dojke znaša 60,7 % in se pri poznih stadijih poveča na 80,0 %. Aktivnost TK ima tudi višjo skupno občutljivost kot CA 15-3 in meri 64,5 %. Specifičnost znaša 88,5 % in je nekoliko nižja kot pri CA 15-3. Precej večja kot pri CA 15-3 je prav tako površina pod ROC krivuljo, ki znaša 0,926. Iz tega lahko razberemo, da je diagnostična uporabnost aktivnosti TK veliko večja kot pri CA 15-3.

Rezultati meritev koncentracije TK se razlikujejo od naših pričakovanj. Vrednosti ne naraščajo skladno z naraščanjem stadija raka dojke, pri poznih stadijih se pojavijo samo posamezne meritve z visoko vrednostjo koncentracije TK. Z Mann-Whitneyevim testom smo dokazali, da je povprečna vrednost kontrolne skupine (0,257 ng/mL) statistično pomembno nižja od povprečne vrednosti skupine bolnic (0,266 ng/mL). Povprečna

vrednost kontrolne skupine je statistično pomembno višja od tiste pri začetnih stadijih (0,248 ng/mL). Povprečni vrednosti med kontrolno skupino in skupino poznih stadijev (0,340 ng/mL) se statistično pomembno ne razlikujeta, kot tudi ne med skupinama začetnih in poznih stadijev. Meritve v skupini poznih stadijev so glede na SD in IQR bolj razpršeni kot v ostalih skupinah. Občutljivost je v začetnih stadijih nizka (27,9 %) in le malo naraste pri poznih stadijih raka dojke (33,3 %). Specifičnost koncentracije TK znaša 53,8 %, kar je nižje tako od CA 15-3 kot tudi od aktivnosti TK. Občutljivost pri vseh bolnicah skupaj je sicer višja kot pri CA 15-3 in znaša 28,9 %, vendar še vseeno precej nižja kot pri aktivnosti TK. Površina pod ROC krivuljo meri 0,320, kar je najnižja vrednost od vseh obravnavanih tumorskih označevalcev. Zaradi tako nizke površine pod ROC krivuljo, koncentracija TK nima diagnostične uporabnosti. Koncentracija TK se nam zaradi nizke občutljivosti in specifičnosti ne zdi uporaben tumorski označevalec za odkrivanje raka dojke kot tudi ne za spremljanje njegovega napredovanja. Vzroke za slabšo občutljivost in specifičnost koncentracije TK lahko morda iščemo v majhnem vzorcu bolnic v poznih stadijih raka dojke. Ob interpretaciji rezultatov koncentracije TK moramo imeti v mislih tudi, da se koncentracija nanaša na velikost tumorja raka dojke in bi bilo te vrednosti smiselno primerjati še s kakšno drugo diagnostično metodo, s katero bi pridobili dejansko velikost tumorja, in tako nekoliko bolj realen vpogled v rezultate koncentracije TK.

Izračunali smo tudi kvocient med aktivnostjo TK in koncentracijo TK. S tem parametrom smo želeli prikazati agresivnost tumorja glede na njegovo velikost. Rezultati dajejo spodbudne napovedi glede uporabnosti tega parametra v diagnostiki raka dojke. Z Mann-Whitneyevim testom smo dokazali, da je povprečna vrednost kvocientov v skupini bolnic statistično pomembno višja kot v kontrolni skupini. Statistično pomembno razliko smo dokazali tudi med skupinama bolnic v začetnih stadijih in poznih stadijih raka dojke, ter med njima in kontrolno skupino. Kvocient narašča skupaj z naraščajočim stadijem raka dojke, iz česar lahko sklepamo da narašča skladno z naraščanjem agresivnosti tumorja. Povečuje se povprečna vrednost, ki meri 0,008 U/ng pri kontrolni skupini, 0,066 U/ng pri začetnih stadijih in 0,092 U/ng pri končnih stadijih raka dojke. Občutljivost kvocienta je pri bolnicah z začetnim stadijem raka dojke 95,1 %, medtem ko je pri bolnicah s poznim stadijem kar 100 %. Specifičnost znaša 61,5 % in je nekoliko nižja kot pri CA 15-3 in aktivnosti TK. Občutljivost kvocienta aktivnost TK/koncentracija TK pri vseh bolnicah skupaj znaša 96,1 %, kar je največ od vseh obravnavanih tumorskih označevalcev. Najvišja

med vsemi je tudi površina pod ROC krivuljo, ki meri 0,936. To pomeni, da ima kvocient največjo diagnostično uporabnost med vsemi obravnavanimi tumorskimi označevalci. Za popolnejšo interpretacijo rezultatov bi meritve lahko prav tako primerjali še z drugo diagnostično metodo za določitev velikosti tumorja in bi dobili še boljši vpogled v napovedovanje agresivnosti tumorja glede na njegovo velikost.

Med posameznimi tumorskimi označevalci smo izračunali tudi Spearmanov koeficient korelacije. Med meritvami parov aktivnost TK in koncentracija TK, aktivnost TK in CA 15-3, koncentracija TK in CA 15-3 in kvocient aktivnosti TK/koncentracija TK in CA 15-3 ni statistično pomembne korelacije. Med aktivnostjo TK in kvocientom aktivnost TK/koncentracija TK obstaja statistično pomembna korelacija pri signifikantnosti stopnji 0,01. Spearmanov kvocient korelacije znaša 0,872, kar predstavlja visoko stopnjo korelacije. Statistično pomembna korelacija na signifikantnosti stopnji 0,05 obstaja tudi med koncentracijo TK in kvocientom aktivnost TK/koncentracija TK. Spearmanov koeficient korelacije znaša -0,288, kar pomeni da je korelacija šibka in negativna. Medtem ko ena spremenljivka narašča, druga upada. Ti dve korelaciji sta sicer pričakovani, saj smo kvocient izračunali iz aktivnosti TK in koncentracije TK.

Pri vrednotenju rezultatov tumorskih označevalcev moramo vedno upoštevati tudi dejstvo, da tumorski označevalci ne nastajajo le pri malignih procesih. To so endogene snovi, ki lahko nastajajo tudi pri drugih bolezenskih stanjih in različnih fizioloških procesih in tako vplivajo na vrednotenje rezultatov preko povišanja lažno pozitivnih rezultatov in s tem povezano znižanje specifičnosti. Seveda lahko specifičnost povišamo s povečanjem referenčne vrednosti, a ob tem znižamo občutljivost tumorskega označevalca.

## 6. Sklep

V magistrski nalogi smo želeli oceniti pomen in doprinos TK kot tumorskega označevalca v laboratorijski diagnostiki raka dojke. Kot uporabna tumorska označevalca sta se izkazala predvsem aktivnost TK in kvocient aktivnost TK/koncentracija TK, medtem ko koncentracija kot samostojni parameter ne izpolnjuje naših pričakovanj. Prišli smo do naslednjih zaključkov:

1. Koncentracija TK ne narašča skladno z napredovanjem bolezni.
2. Aktivnost TK narašča skladno z napredovalo boleznijo, prav tako tudi kvocient med aktivnostjo TK in koncentracijo TK.
3. Kvocient med aktivnostjo TK in koncentracijo TK se je pokazal kot boljši tumorski označevalec kot samo koncentracija TK, in kot primerljiv z aktivnostjo TK.
4. Aktivnost TK in kvocient aktivnost TK/koncentracija TK imata boljšo občutljivost predvsem v nižjih stadijih raka dojke kot CA 15-3, višja pa je tudi občutljivost v poznih stadijih in skupna občutljivost pri vseh bolnicah.
5. Za še boljšo interpretacijo rezultatov, predvsem koncentracije TK in delno tudi kvocienta med aktivnostjo TK in koncentracijo TK, bi potrebovali podatke o velikosti tumorja, pridobljenih z neko drugo diagnostično metodo.
6. Za boljšo reprezentativnost rezultatov bi bil potreben večji vzorec bolnic, še posebej pri bolnicah s poznim stadijem raka dojke.

## 7. Literatura

- (1) Kobe V., Dekleva A., Lenart I. F., Širca A., Velepčič M.: *Anatomija, skripta za študente medicine 4. del*, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana, 2012: 156 – 158
- (2) Ribarič S.: *Temelji patološke fiziologije, 2. izdaja*, UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2011: 114
- (3) American Cancer Society: *Breast Cancer*, American Cancer Society, 2014
- (4) [http://dora.onko-i.si/domov/index.html?no\\_cache=1](http://dora.onko-i.si/domov/index.html?no_cache=1), ogled: 10.5.2016
- (5) Bishop M. L., Duben-Engelkirk J. L., Fody E. P.: *Clinical chemistry: principles, procedures, correlations*, Lippincott Williams & Wilkins, 2000
- (6) Osredkar J.: *Izbrana poglavja iz klinične kemije*, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2008: 92 - 105
- (7) Novaković S.: *Tumorski označevalci v klinični onkologiji*, Onkologija/pregledi: 8-13
- (8) <http://www.nature.com/nrclinonc/journal/v5/n10/full/ncponc1187.html>, ogled: 7.1.2017
- (9) Harris L., Fritsche H., Mennel R., Norton L., Ravdin P., Taube S., Somerfield M. R., Hayes D. F., Bast Jr R. C.: *American Society of Clinical Oncology 2007 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer*, Journal of Clinical Oncology, 2007; 33: 5287-5312
- (10) Biovica: *Why serum thymidine kinase activity can be a useful biomarker in cancer therapy and development*, Biovica perspective on biomarkers 2015:1.1: 1-4
- (11) Topolcan O., Holubec Jr L.: *The role of thymidine kinase in cancer diseases*, Expert Opin. Med. Diagn., 2008: 129-141

- 
- (12) O'Neill K. L., Buckwalter M, Murray B. K.: *Thymidine kinase: diagnostic and prognostic potential*, Expert Rev. Mol. Diagn. 1(4), 2001: 89-94
- (13) <http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Kemiluminiscenca>, ogled: 26.11.2016
- (14) *DiaSorin LIAISON® CA 15-3 (REF 314301)*, Instructions.
- (15) *DiaSorin LIAISON® Thymidine Kinase (REF 310960)*, Instructions.
- (16) [http://www.selectscience.net/images/articles/8550\\_liaison.jpg.ashx?width=250](http://www.selectscience.net/images/articles/8550_liaison.jpg.ashx?width=250), ogled: 12.12.2016
- (17) Štrukelj B., Kos J.: *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 178-180
- (18) Kiran Kumar J., Aronsson A.C., Pilko G., Zupan M., Kumer K., Fabjan T., Osredkar J., Eriksson S.: *A clinical evaluation of the TK 210 ELISA in sera from breast cancer patients demonstrates high sensitivity and specificity in all stages of disease*, Tumor Biology, 2016, 37 (9): 11937-11945

## 8. Priloga

V naslednjih preglednicah so predstavljene vse meritve tumorskih označevalcev, ki smo jih izvedli v okviru magistrske naloge. V preglednici XXII so predstavljene meritve vseh tumorskih označevalcev v skupini bolnic, v preglednici XXIII so predstavljene meritve aktivnosti TK, koncentracije TK in kvocienta aktivnost TK/koncentracija TK pri kontrolni skupini, meritve CA 15-3 v kontrolni skupini pa so predstavljene v preglednici XXIV.

Preglednica XXII: Pregled meritev vseh tumorskih iznačevalcev pri vseh bolnicah skupaj.

št. vzorca	starost	TNM	CA 15-3 [U/mL]	aktivnost TK [U/L]	koncentracija TK [ng/mL]	aktiv. TK/konc. TK [U/ng]
1	65	T2N0M0	20	8,3	0,479	0,017
2	47	T2N3aM0	21	5,1	0,228	0,022
3	54	T1bN0M0	16	14,1	0,190	0,074
4	64	T1cN1M0	15	1,4	0,349	0,004
5	45	T1cN1miM0	22	0,5	0,263	0,002
6	72	T2N1M0	15	8,6	0,205	0,042
7	58	T2N0M0	15	6,5	0,190	0,034
8	66	T2N0M0	16	1,7	0,171	0,010
9	58	T2N0M0	12	11,5	0,250	0,046
10	60	TisN0M0	10	0,4	0,250	0,001
11	34	T2N0M0	86	6,8	0,235	0,029
12	58	T1bN0M0	23	7,5	0,546	0,014
13	66	T1cN1miM0	15	5,8	0,189	0,031
14	45	T1cN1miM0	23	2,2	0,220	0,010
15	48	T2N0M0	7	7,1	0,190	0,037
16	81	T2N0M0	6	11,6	0,349	0,033
17	72	T3N2M0	18	54,3	0,424	0,128
18	77	T1cN0M0	24	15,4	0,232	0,066
19	64	T1cN0M0	19	9,2	0,226	0,041



20	88	T2N1M0	12	3,9	0,198	0,020
21	27	T1cN0M0	25	4,2	0,171	0,025
22	53	T2N0M0	27	7,1	0,171	0,042
23	60	T3N2aM0	64	36	0,906	0,040
24	91	T3N1M0	20	8,5	0,218	0,039
25	78	T2N0M0	20	5,4	0,198	0,027
26	49	T2N1M0	20	24,1	0,246	0,098
27	64	T2N1M0	34	24,6	0,246	0,100
28	40	T2N1M0	17	19,1	0,265	0,072
29	59	T1cN1aM0	15	2,2	0,171	0,013
30	65	T1bN0M0	29	7	0,174	0,040
31	66	T2N0M0	39	2,4	0,190	0,013
32	39	T1cN0M0	15	14,6	0,259	0,056
33	38	T2N1M0	15	31,8	0,289	0,110
34	62	T1bN0M0	23	20,6	0,171	0,120
35	35	T4dN2bM0	46	40	0,826	0,048
36	54	T1cN0M0	14	19,1	0,181	0,106
37	64	TisN0M0	20	40,6	0,533	0,076
38	47	T1cN1aM0	20	5,2	0,213	0,024
39	85	T2N0M0	37	11,5	0,237	0,049
40	67	T1cN0M0	16	8,9	0,213	0,042
41	57	T2N0M0	18	7,5	0,213	0,035
42	29	T1cN0M0	10	12,1	0,256	0,047
43	31	T1cN0M0	14	22,3	0,172	0,130
44	54	T3N1M0	19	26,9	0,171	0,157
45	42	T1cN0M0	39	19,1	0,171	0,112
46	58	T1cN0M0	9	27,2	0,185	0,147
47	63	T1cN3aM0	38	25	0,171	0,146
48	78	T2N3aM0	29	34,4	0,172	0,200
49	32	T1cN0M0	6	29,7	0,171	0,174
50	67	T1bN3aM0	15	38,1	0,178	0,214
51	57	T2N2M0	41	17,7	0,171	0,104
52	65	T1bN1miM0	8	16,5	0,171	0,096
53	45	T2N1aM0	9	15,8	0,321	0,049
54	65	T2N1miM0	32	21,2	0,342	0,062
55	80	T4bN0M0	31	25,4	0,244	0,104
56	39	T3N1M0	14	7,8	0,171	0,046
57	31	T4N0M0	34	6,9	0,171	0,040
58	73	T4N0M0	22	20,4	0,275	0,074
59	57	T1bN0M0	13	34	0,171	0,199
60	46	T1cN0M0	19	32,3	0,354	0,091
61	41	T2N0M0	29	34,2	0,213	0,161
62	36	T1cN0M0	43	55	0,192	0,286
63	49	T1bN1miM0	14	18,4	0,171	0,108

64	59	T2N0M0	14	10,9	0,465	0,023
65	83	T1cN0M0	23	6,7	0,171	0,039
66	46	T1cN0M0	24	5,8	0,182	0,032
67	54	T1bN0M0	18	10,4	0,190	0,055
68	30	T2N0M0	10	9,8	0,613	0,016
69	48	T1cN1M0	16	10,3	0,226	0,045
70	80	T2N2M0	24	16	0,771	0,021
71	53	T2N0M0	24	5,3	0,235	0,022
72	66	T1bN1M0	46	9,9	0,250	0,040
73	47	T1aN0M0	15	6,3	0,314	0,020
74	73	T1cN0M0	19	9,5	0,383	0,025
75	67	T1bN0M0	8	8,7	0,173	0,050
76	50	T2N0M0	12	6,4	0,171	0,037

Preglednica XXIII: Meritve aktivnosti TK, koncentracije TK in izračun kvocienta aktivnost TK/koncentracija TK pri kontrolni skupini.

št. vzorca	starost	aktivnost TK [U/L]	koncentracija TK [ng/mL]	aktiv. TK/konc. TK [U/ng]	št. vzorca	starost	aktivnost TK [U/L]	koncentracija TK [ng/mL]	aktiv. TK/konc. TK [U/ng]
1	42	0,4	0,254	0,001	27	40	0,4	0,244	0,001
2	38	2,1	0,256	0,008	28	33	0,4	0,25	0,001
3	27	0,4	0,266	0,001	29	47	0,4	0,229	0,002
4	37	2,4	0,251	0,010	30	41	0,4	0,24	0,001
5	43	0,4	0,234	0,002	31	50	0,6	0,222	0,003
6	56	6	0,26	0,023	32	46	0,4	0,232	0,002
7	35	4	0,25	0,016	33	50	4,6	0,244	0,019
8	43	0,6	0,237	0,003	34	50	0,4	0,244	0,001
9	38	8,3	0,374	0,022	35	38	1,6	0,226	0,007
10	52	2,7	0,257	0,011	36	46	1	0,225	0,004
11	47	2,2	0,241	0,009	37	46	1,2	0,22	0,005
12	36	12,7	0,374	0,034	38	32	0,4	0,226	0,002
13	25	3,9	0,271	0,014	39	43	0,4	0,231	0,002
14	20	0,4	0,269	0,001	40	26	0,4	0,263	0,001
15	34	4,3	0,344	0,013	41	57	0,4	0,229	0,002
16	30	14,6	0,271	0,054	42	50	0,7	0,26	0,003
17	52	4,4	0,265	0,017	43	52	0,5	0,228	0,002
18	58	2,7	0,237	0,011	44	47	1,4	0,234	0,006
19	35	0,4	0,249	0,001	45	21	3,8	0,257	0,015
20	41	0,5	0,27	0,002	46	51	2,5	0,251	0,010
21	42	0,7	0,256	0,003	47	59	9,4	0,253	0,037
22	62	0,4	0,234	0,002	48	50	0,4	0,26	0,001

23	37	0,7	0,244	0,003	49	52	3,8	0,231	0,016
24	24	0,6	0,262	0,002	50	49	0,4	0,246	0,001
25	53	0,4	0,257	0,001	51	29	0,4	0,337	0,001
26	41	0,8	0,254	0,003	52	27	0,4	0,346	0,001

Preglednica XXIV: Pregled meritev CA 15-3 v kontrolni skupini.

št. vzorca	starost	CA 15-3 [U/mL]	št. vzorca	starost	CA 15-3 [U/mL]	št. vzorca	starost	CA 15-3 [U/mL]
1	90	9,6	33	61	11,2	64	31	17,9
2	31	8,8	34	50	14,8	65	76	6,5
3	28	18,5	35	58	17,4	66	34	14,2
4	74	16,9	36	72	20,8	67	56	8,8
5	64	12,6	37	78	22,2	68	72	10,1
6	65	18,4	38	48	20,7	69	76	14,3
7	84	24,1	39	81	16,4	70	73	16,6
8	51	16,1	40	62	13,4	71	50	18,7
9	69	22,1	41	48	27,4	72	68	9,7
10	82	28,4	42	57	7,5	73	89	21,6
11	64	11,4	43	45	23,1	74	53	26,8
12	65	8,1	44	80	22,3	75	36	14,6
13	67	5,3	45	52	27,9	76	61	25,3
14	43	13,3	46	61	12,2	77	65	6,9
15	62	19,4	47	46	5,9	78	29	17,0
16	44	18,4	48	63	18,5	79	57	31,1
17	61	23,7	49	71	12,2	80	63	33,8
18	86	24,6	50	44	17,6	81	62	28,6
19	57	32,1	51	45	18,4	82	65	15,8
20	85	16,5	52	46	28,2	83	49	23,7
21	38	11,8	53	45	26,9	84	81	19,9
22	77	22,9	54	77	30,6	85	47	12,9
23	56	43,1	55	82	20,6	86	35	13,7
24	48	19,5	56	65	14,4	87	54	15,4
25	50	24,3	57	65	6,7	88	54	19,3
26	73	17,4	58	74	8,5	89	36	22,6
27	42	15,7	59	52	9,5	90	66	9,8
28	57	10,9	60	68	23,9	91	73	28,7
29	51	26,0	61	37	22,5	92	56	7,1
30	64	14,0	62	61	13,5	93	59	28,2
31	28	15,0	63	82	23,9	94	73	10,0
32	81	20,4						



## 9. Dodatek

Pri magistrski nalogi smo obravnavali vzorce 76 bolnic z rakom dojke. Kontrolna skupina za aktivnost TK je štela 54 vzorcev, za koncentracijo TK in kvocient aktivnost TK/koncentracija TK 53 vzorcev, ter za vrednosti CA 15-3 94 vzorcev.

### 9.1 Koncentracija TK

Referenčno vrednost za koncentracijo TK v serumu smo določili iz kontrolne skupine in znaša 0,196 ng/mL. Z Mann-Whitneyevim testom smo želeli dokazati statistično pomembno razliko v povprečni vrednosti koncentracije TK med kontrolno skupino in skupino bolnic. Rezultati so prikazani v preglednici I. Postavili smo naslednji hipotezi:

H<sub>0</sub>: Povprečni vrednosti obeh skupin izhajata iz istih populacij.

H<sub>a</sub>: Povprečni vrednosti skupin izhajata iz različnih populacij.

Preglednica I: Rezultati Mann-Whitneyevega testa za koncentracijo TK.

	<b>povprečni rang</b>	<b>vsota rangov</b>	<b>Mann Whitney U</b>	<b>Z vrednost</b>	<b>p vrednost</b>
<b>kontrolna skupina</b>	36,32	1925,00	494,00	-7,345	0,000
<b>skupina bolnic</b>	85,00	6560,00			

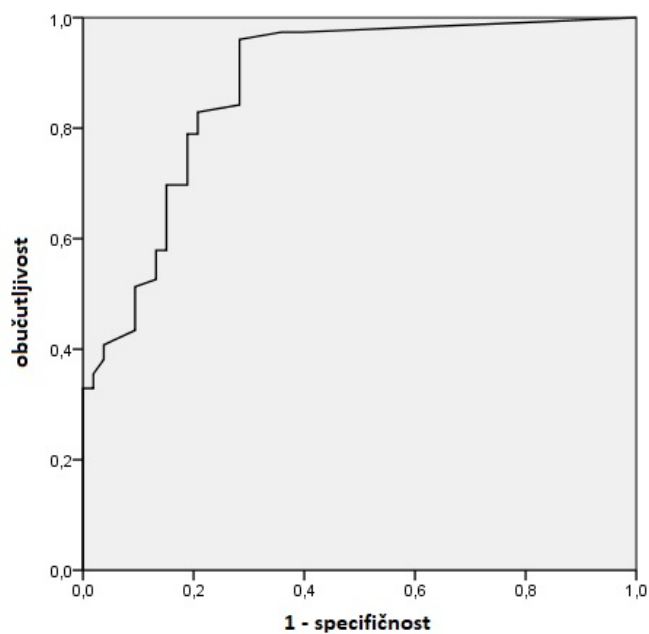
Ker je p vrednost manjša od 0,05 lahko zavrnemo ničelno hipotezo in sprejmemo alternativno. Med povprečno vrednostjo skupine bolnic in povprečno vrednostjo kontrolne skupine obstaja statistično pomembna razlika. Izvedli smo tudi deskriptivno statistično analizo za meritve koncentracije TK ter izračunali občutljivost in specifičnost. Rezultati so prikazani v preglednici II.

Preglednica III: Rezultati deskriptivne analize z občutljivostjo in specifičnostjo za koncentracijo TK pri bolnicah in kontrolni skupini.

	<b>skupina bolnic</b>	<b>kontrolna skupina</b>
<b>povišane vrednosti</b>	74 vzorcev (97,4 %)	19 vzorcev (35,8 %)
<b>MIN</b>	0,170 ng/mL	0,170 ng/mL
<b>MAX</b>	1,235 ng/mL	0,330 ng/mL

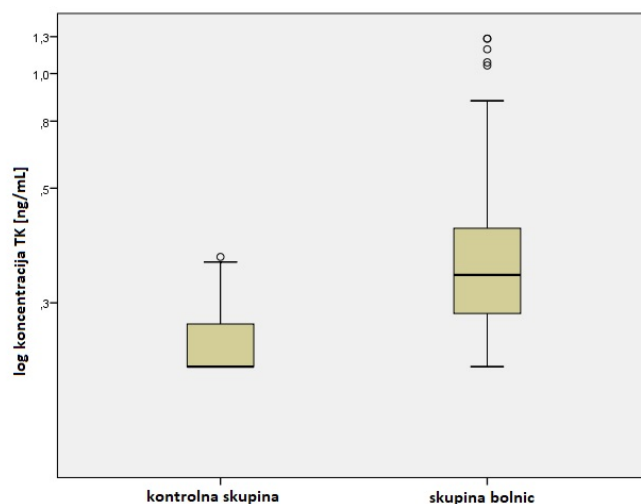
<b>PV</b>	0,379 ng/mL	0,200 ng/mL
<b>SD</b>	0,251 ng/mL	0,482 ng/mL
<b>IQR</b>	0,160 ng/mL	0,050 ng/mL
<b>občutljivost</b>	97,4 %	/
<b>specifičnost</b>	64,2 %	/

Pri skupini vseh bolnic smo za koncentracijo TK skonstruirali ROC krivuljo, ki je prikazana na sliki 9.1. Površina pod krivuljo meri 0,877.



Slika 9.1: ROC krivulja za koncentracijo TK.

Na sliki 9.2 so prikazane meritve koncentracije TK pri bolnicah v primerjavi s kontrolno skupino.



Slika 9.2: Meritve koncentracije TK pri bolnicah v primerjavi s kontrolno skupino.

Z Mann-Whitneyevim testom smo želeli dokazati statistično pomembno razliko tudi med povprečnimi vrednostmi skupin z začetnimi in poznimi stadiji raka dojke ter kontrolno skupino. Postavili smo hipotezi:

$H_0$ : Povprečni vrednosti obeh skupin izhajata iz iste populacije.

$H_a$ : Povprečni vrednosti izhajata iz različnih populacij.

Rezultati so prikazani v preglednici III.

Preglednica IIIII: Rezultati Mann-Whitneyevega testa za koncentracijo TK med skupinama začetnih in poznih stadijev ter kontrolne skupine.

	<b>povprečni rang</b>	<b>vsota rangov</b>	<b>Mann Whitney U</b>	<b>Z vrednost</b>	<b>p vrednost</b>
<b>kontrolna skupina</b>	34,78	1843,50	412,50	-6,934	0,000
<b>začetni stadiji</b>	77,24	4711,50			
<b>kontrolna skupina</b>	28,54	1512,50	81,50	-4,940	0,000
<b>pozni stadiji</b>	55,57	833,50			
<b>začetni stadiji</b>	37,49	2287,00	396,00	-0,803	0,422
<b>pozni stadiji</b>	42,60	639,00			

Glede na to, da je samo p vrednost med skupinama začetnih stadijev in poznih stadijev večja od 0,05, lahko ugotovimo da povprečni vrednosti teh dveh skupin izhajata iz iste populacije.

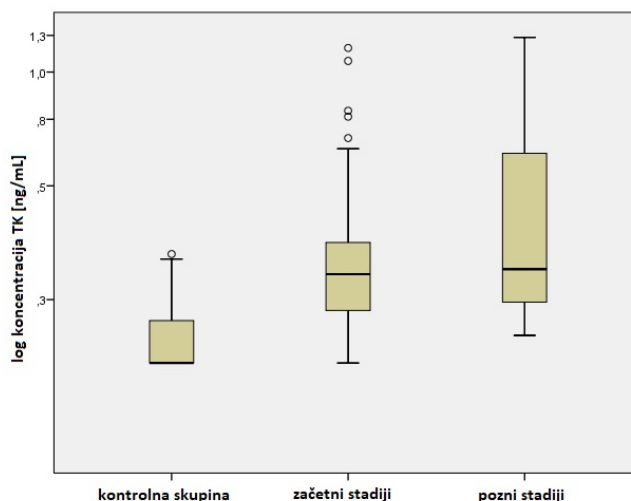
Pri ostalih primerjavah je p vrednost manjša od stopnje tveganja, kar pomeni da obstaja statistično pomembna razlika med povprečnimi vrednostmi.

Na meritvah koncentracije TK pri začetnih in poznih stadijih raka dojke smo naredili tudi deskriptivno statistično analizo ter izračunali občutljivost in specifičnost tumorskega označevalca. Rezultate smo primerjali s kontrolno skupino in so prikazani v preglednici IV.

Preglednica IV: Parametri deskriptivne statistične analize z izračuni občutljivosti in specifičnosti koncentracije TK pri začetnih in poznih stadijih ter kontrolni skupini.

	<b>začetni stadiji</b>	<b>pozni stadiji</b>	<b>kontrolna skupina</b>
<b>povišane vrednosti</b>	59 vzorcev (96,7 %)	15 vzorcev (100 %)	19 vzorcev (35,8 %)
<b>MIN</b>	0,170 ng/mL	0,201 ng/mL	0,170 ng/mL
<b>MAX</b>	1,158 ng/mL	1,235 ng/mL	0,330 ng/mL
<b>PV</b>	0,351 ng/mL	0,495 ng/mL	0,200 ng/mL
<b>SD</b>	0,199 ng/mL	0,387 ng/mL	0,485 ng/mL
<b>IQR</b>	0,138 ng/mL	0,613 ng/mL	0,050 ng/mL
<b>občutljivost</b>	96,7 %	100 %	/
<b>specifičnost</b>	64,2 %	64,2 %	/

Meritve koncentracije TK pri začetnih stadijih in poznih stadijih raka dojke v primerjavi s kontrolno skupino so prikazani na sliki 9.3.



Slika 9.3: Meritve koncentracije TK pri začetnih in poznih stadijih raka dojke ter kontrolni skupini.



## 9.2 Kvocient aktivnost TK/koncentracija TK

Referenčno vrednost smo določili iz kontrolne skupine na 0,009 U/ng. Statistično pomembno razliko med povprečno vrednostjo skupine bolnic in kontrolne skupine smo želeli dokazati z Mann-Whitneyevim testom. Postavili smo naslednji hipotezi:

H<sub>0</sub>: Povprečni vrednosti obeh skupin izhajata iz iste populacije.

H<sub>a</sub>: Povprečni vrednosti skupin izhajata iz različnih populacij.

Rezultati so prikazani v preglednici V.

Preglednica VIII: Rezultati Mann-Whitneyevega testa za kvocient aktivnost TK/koncentracija TK.

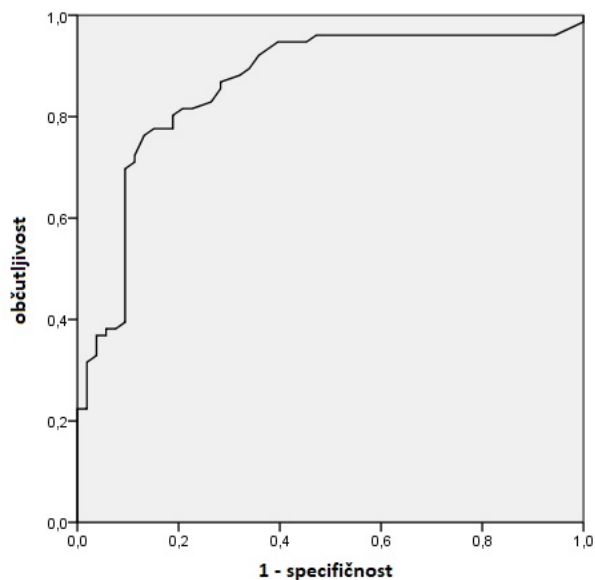
	<b>povprečni rang</b>	<b>vsota rangov</b>	<b>Mann Whitney U</b>	<b>Z vrednost</b>	<b>p vrednost</b>
<b>kontrolna skupina</b>	37,45	1985,00	554,00	-7,001	0,000
<b>skupina bolnic</b>	84,21	6400,00			

Ker je p vrednost manjša od 0,05 lahko privzamemo, da povprečne vrednosti kontrolne skupine in skupine bolnic izhajata iz različnih populacij. Naredili smo tudi deskriptivno statistično analizo in izračunali občutljivost in specifičnost kvocienta. Rezultati so prikazani v preglednici VI.

Preglednica IV: Rezultati deskriptivne analize in izračun občutljivosti in specifičnosti za kvocient aktivnost TK/koncentracija TK.

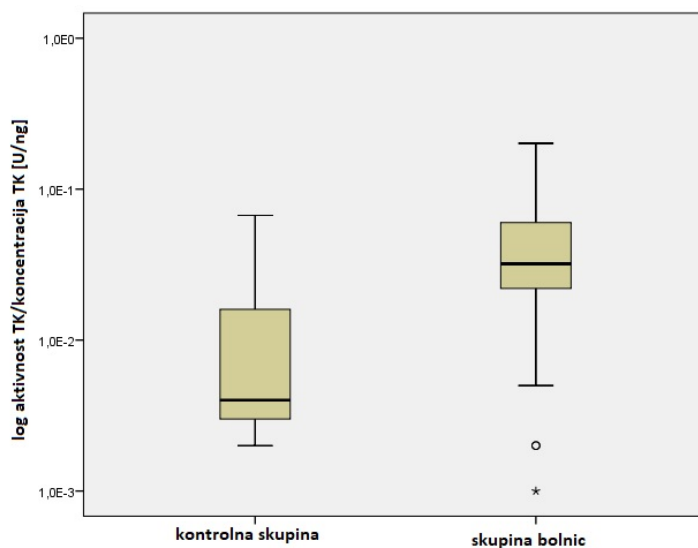
	<b>skupina bolnic</b>	<b>kontrolna skupina</b>
<b>povišane vrednosti</b>	70 vzorcev (92,1 %)	19 vzorcev (35,8 %)
<b>MIN</b>	0,001 U/ng	0,002 U/ng
<b>MAX</b>	0,201 U/ng	0,067 U/ng
<b>PV</b>	0,477 U/ng	0,011 U/ng
<b>SD</b>	0,042 U/ng	0,134 U/ng
<b>IQR</b>	0,039 U/ng	0,013 U/ng
<b>občutljivost</b>	92,1 %	/
<b>specifičnost</b>	64,2 %	/

Izračunali smo ROC krivuljo za kvocient med aktivnostjo TK in koncentracijo TK, ki je prikazana na sliki 9.4. Površina pod krivuljo znaša 0,862.



Slika 9.4: ROC krivulja za kvocient aktivnost TK/koncentracija TK.

Izračuni kvocienta med aktivnostjo in koncentracijo TK pri bolnicah v primerjavi s kontrolno skupino so prikazani na sliki 9.5.



Slika 9.5: Izračunani kvocient med aktivnostjo TK in koncentracijo TK pri bolnicah v primerjavi s kontrolno skupino.

Izračunane kvociente smo razdelili v skupini začetnih stadijev in poznih stadijev raka dojke. Z Mann-Whitneyevim testom smo preverili, ali se povprečne vrednosti posameznih skupin med seboj statistično pomembno razlikujejo ali ne. Postavili smo sledeči hipotezi:

H<sub>0</sub>: Povprečni vrednosti obeh skupin izhajata iz iste populacije.

H<sub>a</sub>: Povprečni vrednosti skupin izhajata iz različnih populacij.

Rezultati so predstavljeni v preglednici VII.

Preglednica VII: Rezultati Mann-Whitneyevega testa za kvocient aktivnost TK/koncentracija TK pri skupinah začetnih in poznih stadijev ter kontrolni skupini.

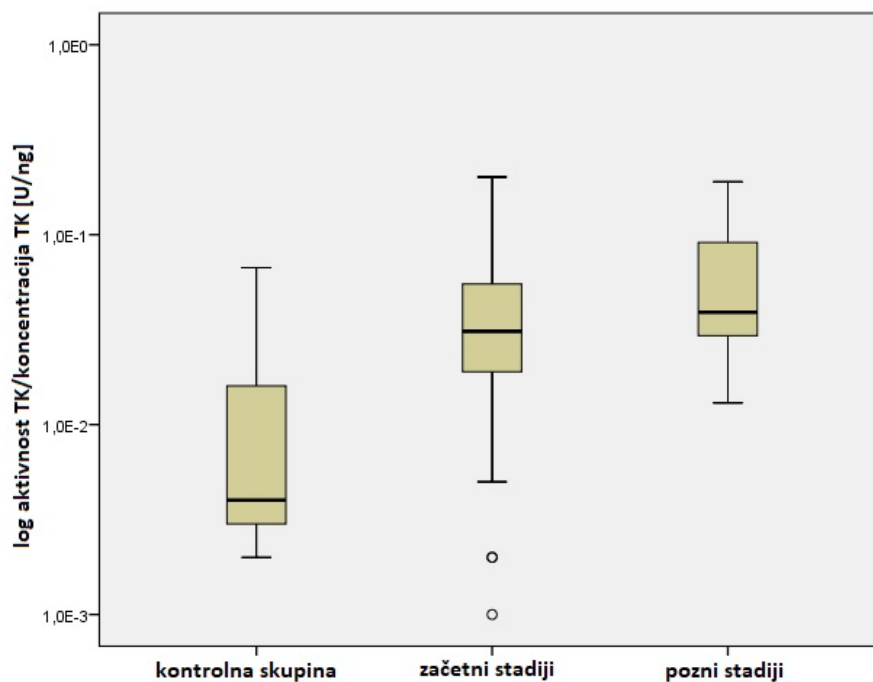
	<b>povprečni rang</b>	<b>vsota rangov</b>	<b>Mann Whitney U</b>	<b>Z vrednost</b>	<b>p vrednost</b>
<b>kontrolna skupina</b>	36,47	1933,00	502,00	-6,348	0,000
<b>začetni stadiji</b>	75,77	4622,00			
<b>kontrolna skupina</b>	27,98	1483,00	52,00	-5,169	0,000
<b>pozni stadiji</b>	57,53	863,00			
<b>začetni stadiji</b>	36,16	2206,00	315,00	-1,860	0,063
<b>pozni stadiji</b>	48,00	720,00			

Med povprečnimi vrednostmi kontrolne skupine ter skupine začetnih stadijev ter med kontrolno skupino in skupino poznih stadijev obstaja statistično pomembna razlika, saj je p vrednost manjša od 0,05, kar pa ne velja tudi za povprečne vrednosti začetnih in poznih stadijev raka dojke, kjer je p vrednost večja od 0,05 in ne moremo sprejeti alternativne hipoteze.

Za izračunane kvociente aktivnost TK/koncentracija TK, razdeljene v dve skupini glede na stadij raka dojke, smo naredili tudi deskriptivno statistično analizo. Izračunali smo tudi občutljivost in specifičnost tumorskega označevalca. Rezultati so navedeni v preglednici VIII. Izračunani kvocienti, razdeljeni v skupini začetnih in poznih stadijev, v primerjavi s kontrolno skupino so prikazani na sliki 9.6.

Preglednica VIIIIV: Rezultati deskriptivne analize z občutljivostjo in specifičnostjo za kvocient aktivnost TK/koncentracija TK pri začetnih stadijih, poznih stadijih in kontrolni skupini.

	<b>začetni stadiji</b>	<b>pozni stadiji</b>	<b>kontrolna skupina</b>
<b>povišane vrednosti</b>	55 vzorcev (90,2 %)	15 vzorcev (100 %)	19 vzorcev (35,8 %)
<b>MIN</b>	0,001 U/ng	0,013 U/ng	0,002 U/ng
<b>MAX</b>	0,201 U/ng	0,190 U/ng	0,067 U/ng
<b>PV</b>	0,433 U/ng	0,066 U/ng	0,011 U/ng
<b>SD</b>	0,039 U/ng	0,052 U/ng	0,134 U/ng
<b>IQR</b>	0,037 U/ng	0,068 U/ng	0,013 U/ng
<b>občutljivost</b>	90,2 %	100 %	/
<b>specifičnost</b>	64,2 %	64,2 %	/



Slika 9.6: Izračunani kvocienti aktivnost TK/koncentracija TK pri začetnih stadijih, poznih stadijih in kontrolni skupini.

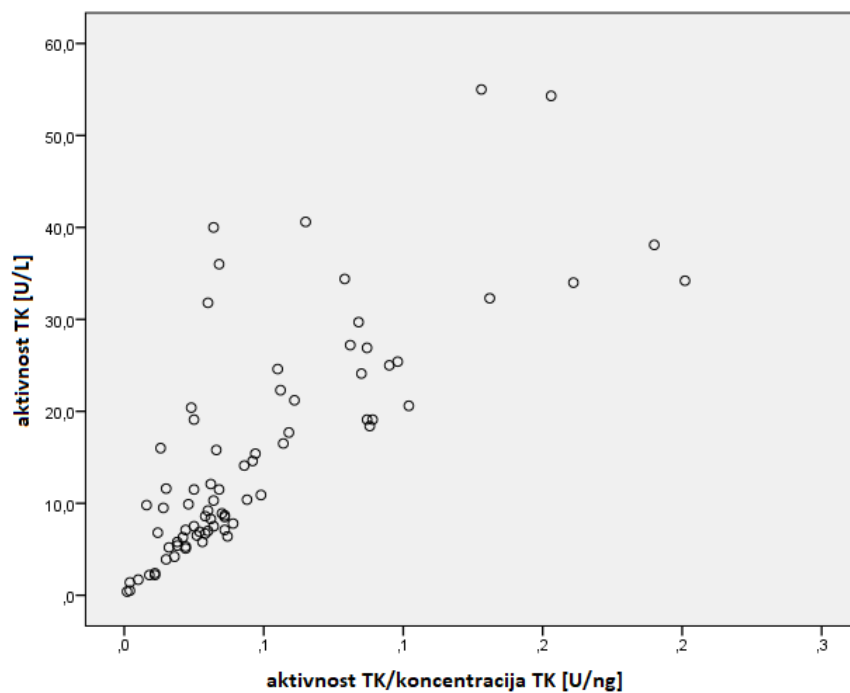
### 9.3 Korelacije med posameznimi tumorskimi označevalci

Da bi ugotovili povezanost med posameznimi tumorskimi označevalci, smo izračunali medsebojne korelacije. Ker se naše meritve ne porazdeljujejo po Gaussovi krivulji, smo uporabili Spearmanov koeficient korelacije. Izračunani koeficienti korelacije so prikazani v preglednici IX.

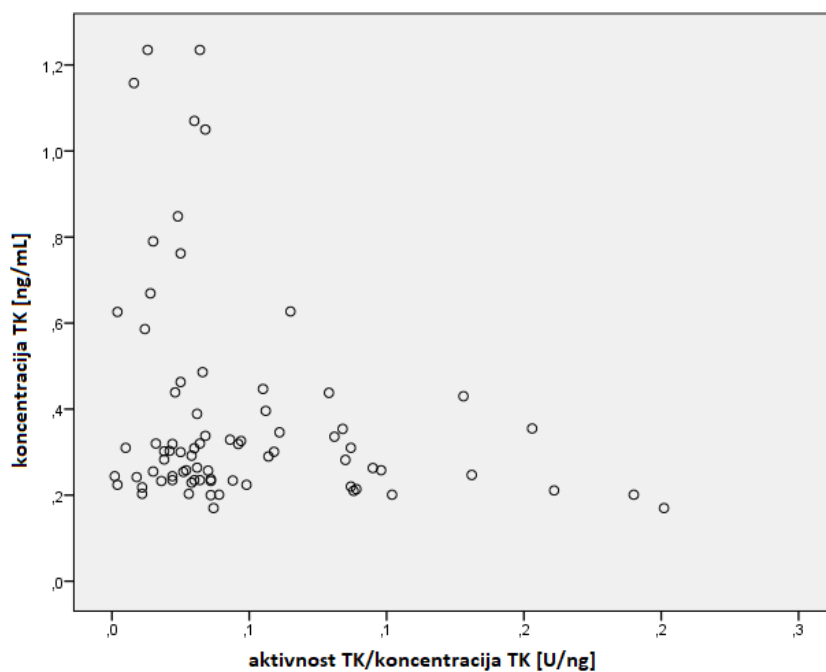
Preglednica IX: Spearmanovi koeficienti korelacije med posameznimi tumorskimi označevalci.

	<b>CA 15-3</b>	<b>aktivnost TK</b>	<b>koncentracija TK</b>	<b>kvocient aktivnost TK/koncentracija TK</b>
<b>CA 15-3</b>	/	0,093	0,055	0,023
<b>aktivnost TK</b>	0,093	/	0,332	0,798
<b>koncentracija TK</b>	0,055	0,332	/	-0,200
<b>kvocient aktivnost TK/koncentracija TK</b>	0,023	0,798	-0,200	/

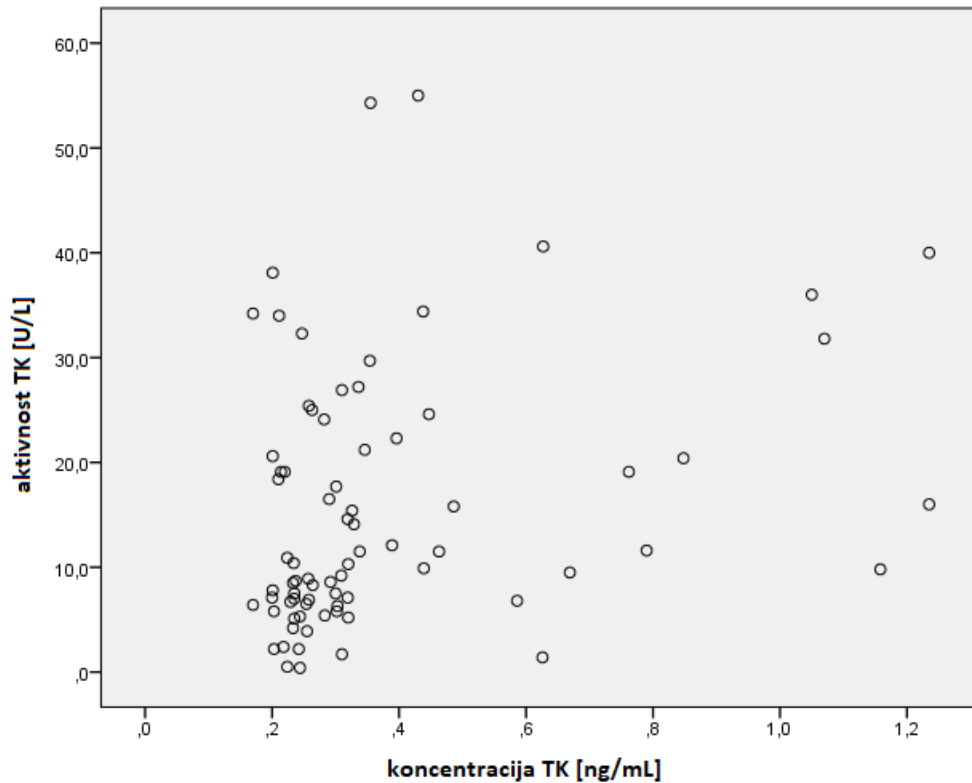
Iz Spearmanovih koeficientov korelacije lahko razberemo, da so prisotne tri statistično pomembne korelacije. Med aktivnostjo TK in kvocientom aktivnost TK/koncentracija TK je prisotna močna pozitivna korelacija, kar pomeni, da obe spremenljivki skupaj naraščata. Korelacijski diagram med njima je prikazan na sliki 9.7. Druga statistično pomembna korelacija je negativna korelacija med koncentracijo TK in kvocientom med aktivnostjo TK in koncentracijo TK. Negativna korelacija pomeni, da vrednosti ene spremenljivke naraščajo, medtem ko vrednosti druge upadajo. Korelacija je sicer šibka. Korelacijski diagram med koncentracijo TK in kvocientom aktivnost TK/koncentracija TK je prikazan na sliki 9.8. Tretja statistično pomembna pozitivna korelacija je med aktivnostjo in koncentracijo TK. Korelacijski diagram je prikazan na sliki 9.9.



Slika 9.7: Korelacijski diagram med aktivnostjo TK in kvocientom aktivnost TK/koncentracija TK.



Slika 9.8: Korelacijski diagram med koncentracijo TK in kvocientom aktivnost TK/koncentracijo TK.



Slika 9.9: Korelacijski diagram med aktivnostjo TK in koncentracijo TK.

## 9.4 Razprava

Prav tako se je za uporaben tumorski označevalec izkazala koncentracija TK. Vrednosti naraščajo skladno z naraščanjem stadija raka dojke. Z Mann-Whitneyevim testom smo dokazali, da je povprečna vrednost kontrolne skupine (0,200 ng/mL) statistično pomembno nižja od povprečne vrednosti skupine bolnic (0,379 ng/mL). Povprečna vrednost kontrolne skupine je statistično pomembno nižja od tiste pri začetnih stadijih (0,351 ng/mL). Povprečni vrednosti med skupino začetnih in skupino poznih stadijev (0,495 ng/mL) se statistično pomembno ne razlikujeta, medtem ko obstaja statistično pomembna razlika med kontrolno skupino in skupino poznih stadijev. Občutljivost je visoka že pri začetnih stadijih (96,7 %) in naraste pri poznih stadijih raka dojke (100 %). Specifičnost koncentracije TK znaša 64,2 %, kar je nižje tako od aktivnosti TK in CA 15-3. Občutljivost pri vseh bolnicah skupaj je zelo visoka, in sicer 97,4%, kar je največ od vseh primerjanih tumorskih označevalcev. Površina pod ROC krivuljo meri 0,877. Zaradi visoke površine pod ROC krivuljo, ima koncentracija TK dobro diagnostično uporabnost in bi bila lahko primeren tumorski označevalec za

odkrivanje raka dojke kot tudi za spremljanje njegovega napredovanja. Ob interpretaciji rezultatov koncentracije TK moramo imeti v mislih tudi, da se koncentracija nanaša na velikost tumorja raka dojke in bi bilo te vrednosti smiselno primerjati še s kakšno drugo diagnostično metodo, s katero bi pridobili dejansko velikost tumorja, in tako še nekoliko bolj realen vpogled v rezultate koncentracije TK.

Izračunali smo tudi kvocient med aktivnostjo TK in koncentracijo TK. S tem parametrom smo želeli prikazati agresivnost tumorja glede na njegovo velikost. Rezultati dajejo spodbudne napovedi glede uporabnosti tega parametra v diagnostiki raka dojke. Z Mann-Whitneyevim testom smo dokazali, da je povprečna vrednost kvocientov v skupini bolnic statistično pomembno višja kot v kontrolni skupini. Statistično pomembno razliko smo dokazali tudi med skupinama bolnic v začetnih stadijih in poznih stadijih raka dojke ter kontrolno skupino, med tem ko med povprečnimi vrednostmi začetnih in poznih stadijev raka dojke ni statistično pomembne razlike. Kvocient narašča skupaj z naraščajočim stadijem raka dojke, iz česar lahko sklepamo da narašča skladno z naraščanjem agresivnosti tumorja. Povprečna vrednost meri 0,011 U/ng pri kontrolni skupini, 0,433 U/ng pri začetnih stadijih in 0,066 U/ng pri končnih stadijih raka dojke. Občutljivost kvocienta je pri bolnicah z začetnim stadijem raka dojke 90,2 %, medtem ko je pri bolnicah s poznim stadijem kar 100 %. Specifičnost znaša 64,2 % in je nekoliko nižja kot pri CA 15-3 in aktivnosti TK, ter primerljiva s koncentracijo TK. Občutljivost kvocienta aktivnost TK/koncentracija TK pri vseh bolnicah skupaj znaša 92,1 %, Najvišja med vsemi tumorskimi označevalci je površina pod ROC krivuljo, ki meri 0,936. To pomeni, da ima kvocient največjo diagnostično uporabnost med vsemi obravnavanimi tumorskimi označevalci. Za popolnejšo interpretacijo rezultatov bi meritve lahko prav tako primerjali še z drugo diagnostično metodo za določitev velikosti tumorja in bi dobili še boljši vpogled v napovedovanje agresivnosti tumorja glede na njegovo velikost.

Med posameznimi tumorskimi označevalci smo izračunali tudi Spearmanov koeficient korelacije. Med meritvami parov aktivnost TK in CA 15-3, koncentracija TK in CA 15-3 in kvocient aktivnosti TK/koncentracija TK in CA 15-3 ni statistično pomembne korelacije. Med aktivnostjo TK in kvocientom aktivnost TK/koncentracija TK obstaja statistično pomembna korelacija pri signifikantnosti stopnji 0,01. Spearmanov kvocient korelacije znaša 0,872, kar predstavlja visoko stopnjo korelacije. Pri tej signifikantnosti stopnji obstaja tudi statistično pomembna pozitivna korelacija med aktivnostjo in koncentracijo TK s Spearmanovim koeficientom 0,332. Statistično pomembna korelacija na signifikantnosti stopnji 0,05 obstaja



tudi med koncentracijo TK in kvocientom aktivnost TK/koncentracija TK. Spearmanov koeficient korelacije znaša -0,288, kar pomeni da je korelacija šibka in negativna. Medtem ko ena spremenljivka narašča, druga upada. Korelaciji med aktivnostjo TK in kvocientom aktivnost TK/koncentracije ter koncentracijo TK in kvocientom aktivnost TK/koncentracija TK sta sicer pričakovani, saj smo kvocient izračunali iz aktivnosti TK in koncentracije TK.

## 9.5 Sklep

V magistrski nalogi smo želeli oceniti pomen in doprinos TK kot tumorskega označevalca v laboratorijski diagnostiki raka dojke. Aktivnost TK, kvocient aktivnost TK/koncentracija TK kot tudi koncentracija TK so se izkazali za uporabne tumorske označevalce pri raku dojke. Prišli smo do naslednjih zaključkov:

1. Vsi trije opazovani parametri TK (aktivnost, koncentracija in kvocient) naraščajo skladno z naraščanjem stadija raka dojke.
2. Kvocient med aktivnostjo TK in koncentracijo TK se je pokazal kot primerljiv tumorski označevalec kot koncentracija TK in aktivnost TK.
3. Koncentracija TK, aktivnost TK in kvocient aktivnost TK/koncentracija TK imajo boljšo občutljivost predvsem v nižjih stadijih raka dojke kot CA 15-3, višja pa je tudi občutljivost v poznih stadijih in skupna občutljivost pri vseh bolnicah.
4. Za še boljšo interpretacijo rezultatov bi potrebovali podatke o velikosti tumorja, pridobljenih z neko drugo diagnostično metodo.
5. Za boljšo reprezentativnost rezultatov bi bil potreben večji vzorec bolnic, še posebej pri bolnicah s poznim stadijem raka dojke.

## 9.6 Meritve

V preglednici X so prikazane meritve koncentracije TK in izračunan kvocient med aktivnostjo TK in koncentracijo TK.

Preglednica X: Meritve koncentracije TK in izračunan kvocient med aktivnostjo TK in koncentracijo TK.

<b>vzorec</b>	<b>koncentracija TK [ng/mL]</b>	<b>kvocient aktivnost TK/koncentracija TK [U/ng]</b>
1	0,264	0,031
2	0,235	0,022
3	0,329	0,043
4	0,626	0,002
5	0,224	0,002
6	0,292	0,029
7	0,254	0,026
8	0,31	0,005
9	0,463	0,025
10	0,244	0,001
11	0,586	0,012
12	0,235	0,032
13	0,302	0,019
14	0,203	0,011
15	0,319	0,022
16	0,79	0,015
17	0,355	0,153
18	0,326	0,047
19	0,309	0,030
20	0,255	0,015
21	0,233	0,018
22	0,2	0,036
23	1,05	0,034
24	0,233	0,036
25	0,283	0,019
26	0,282	0,085
27	0,447	0,055
28	0,22	0,087
29	0,242	0,009
30	0,235	0,030
31	0,218	0,011
32	0,319	0,046
33	1,07	0,030
34	0,201	0,102

35	1,235	0,032
36	0,214	0,089
37	0,627	0,065
38	0,32	0,016
39	0,338	0,034
40	0,257	0,035
41	0,3	0,025
42	0,389	0,031
43	0,396	0,056
44	0,31	0,087
45	0,762	0,025
46	0,336	0,081
47	0,263	0,095
48	0,438	0,079
49	0,354	0,084
50	0,201	0,190
51	0,301	0,059
52	0,29	0,057
53	0,486	0,033
54	0,346	0,061
55	0,258	0,098
56	0,201	0,039
57	0,258	0,027
58	0,848	0,024
59	0,211	0,161
60	0,247	0,131
61	0,17	0,201
62	0,43	0,128
63	0,21	0,088
64	0,224	0,049
65	0,229	0,029
66	0,203	0,028
67	0,234	0,044
68	1,158	0,008
69	0,32	0,032
70	1,235	0,013
71	0,244	0,022
72	0,439	0,023
73	0,303	0,021
74	0,669	0,014
75	0,237	0,036
76	0,17	0,037

V preglednici XI so prikazane meritve kontrolne skupine koncentracije TK in izračunanega kvocienta med aktivnostjo TK in koncentracijo TK pri kontrolni skupini.

Preglednica XI: Meritve koncentracije TK pri kontrolni skupini in izračun kvocienta aktivnost TK/koncentracija TK pri kontrolni skupini.

<b>vzorec</b>	<b>koncentracija TK [ng/mL]</b>	<b>kvocient aktivnost TK/koncentracija TK [U/ng]</b>
1	0,17	0,009
2	0,17	0,006
3	0,17	0,007
4	0,17	0,003
5	0,17	0,003
6	0,305	0,017
7	0,17	0,003
8	0,17	0,003
9	0,17	0,003
10	0,17	0,003
11	0,17	0,003
12	0,17	0,004
13	0,17	0,003
14	0,19	0,024
15	0,17	0,003
16	0,17	0,003
17	0,17	0,003
18	0,17	0,016
19	0,17	0,004
20	0,17	0,003
21	0,17	0,004
22	0,17	0,004
23	0,17	0,004
24	0,204	0,002
25	0,221	0,020
26	0,215	0,020
27	0,196	0,003
28	0,232	0,008
29	0,17	0,003
30	0,285	0,021
31	0,223	0,018
32	0,309	0,047
33	0,332	0,038
34	0,236	0,011
35	0,17	0,013
36	0,17	0,003
37	0,291	0,013
38	0,17	0,022

39	0,257	0,037
40	0,199	0,003
41	0,17	0,012
42	0,2	0,042
43	0,17	0,003
44	0,193	0,007
45	0,17	0,003
46	0,17	0,004
47	0,17	0,015
48	0,235	0,016
49	0,17	0,005
50	0,17	0,003
51	0,32	0,067
52	0,215	0,002
53	0,309	0,002