

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

RENATA BLAZINŠEK

KLINIČNI POMEN DOLOČANJA TUMORSKIH
OZNAČEVALCEV CEA IN CA 19-9 PRI RAKU TREBUŠNE
SLINAVKE

THE CLINICAL VALUE OF TUMOUR MARKERS CEA AND
CA 19-9 IN PANCREATIC CANCER

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana (Poliklinika) pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

Meritve so bile izvedene v laboratoriju v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani.

Zahvaljujem se prof. dr. Jošku Osredkarju za vse nasvete in pomoč pri izdelavi magistrske naloge.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

Renata Blazinšek

Podpis:

Predsednik magistrske komisije: izr. prof. dr. Simon Žakelj

Član magistrske komisije: izr. prof. dr. Janez Mravljak

Ljubljana, 2016

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK	III
KAZALO PREGLEDNIC	IV
KAZALO GRAFOV	IV
POVZETEK	VI
SUMMARY	VII
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV	VIII
1. UVOD	1
1.1 TREBUŠNA SLINAVKA	1
1.1.1 ANATOMIJA IN HISTOLOGIJA TREBUŠNE SLINAVKE	1
1.1.2 FIZIOLOGIJA TREBUŠNE SLINAVKE	2
1.1.2.1 EKSOKRINA FUNKCIJA.....	2
1.1.2.2 ENDOKRINA FUNKCIJA	3
1.1.3. BOLEZNI TREBUŠNE SLINAVKE.....	3
1.1.3.1 RAZVOJNE ANOMALIJE	3
1.1.3.2 AKUTNI PANKREATITIS	4
1.1.3.3 KRONIČNI PANKREATITIS	4
1.1.3.4 RAK TREBUŠNE SLINAVKE	4
1.1.4 KANCEROGENEZA	4
1.1.4.1 PATOGENEZA RAKA TREBUŠNE SLINAVKE NA MOLEKULARNEM NIVOJU.....	6
1.1.4.2 DEJAVNIKI TVEGANJA RAKA TREBUŠNE SLINAVKE.....	7
1.1.5 EKSOKRINI TUMORJI TREBUŠNE SLINAVKE	8
1.1.5.1 SIMPTOMI EKSOKRINIH TUMORJEV TREBUŠNE SLINAVKE	8
1.1.6 ENDOGENI TUMORJI TREBUŠNE SLINAVKE IN SIMPTOMI	9
1.1.7 DIAGNOSTIKA RAKA TREBUŠNE SLINAVKE	10
1.1.8 ZDRAVLJENJE RAKA TREBUŠNE SLINAVKE	11
1.2 TUMORSKI OZNAČEVALCI	13
1.2.1 VREDNOTENJE TUMORSKIH OZNAČEVALCEV	14
1.2.2 CA 19-9	14
1.2.3. CEA	15
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1 REAGENTI, KALIBRATORJI, KONTROLA	17
3.2 INSTRUMENTI IN OPREMA.....	19
3.3 METODA DOLOČANJA	20
3.3.1 PRINCIP METODE CMIA	20
3.3.1.1 STOPNJE CMIA.....	22
3.3.2 AVTOMATIZIRANO DOLOČANJE CEA IN CA 19-9 NA APARATU ARCHITECT	23
3.3.2.1 PRETVORBA PODATKOV V KONCENTRACIJO NA APARATU ARCHITECT	24
3.3.2.2 DOLOČANJE CA 19-9.....	24
3.3.2.3 DOLOČANJE CEA	24
3.3.2.4 KALIBRACIJA CEA in CA 19-9.....	25
3.4 ZBIRANJE IN PRIPRAVA VZORCEV	26
3.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	26
3.5.1 TESTIRANJE NORMALNOSTI PORAZDELITVE	26

3.5.2 TESTIRANJE MOČI POVEZAVE MED CEA IN CA 19-9	27
3.5.3 PRIMERJAVA KONCENTRACIJ CEA in CA 19-9 MED VZORČNIMA SKUPINAMA.....	28
3.5.3.1 MANN-WHITNEYEV U-TEST.....	28
3.5.3.2 WILCOXONOV TEST VSOTE RANGOV (WS).....	29
3.5.4 PRIMERJAVA KONCENTRACIJ CEA in CA 19-9 GLEDE NA LOKACIJO TUMORJA	30
3.5.5 IZRAČUN SPECIFIČNOSTI IN OBČUTLJIVOSTI CEA IN	31
CA 19-9.....	31
3.5.6 IZRAČUN PNV, NNV CEA IN CA 19-9.....	32
3.5.7 ROC KRIVULJA	33
3.5.7.1 AUC	34
4. REZULTATI	35
4.1 PORAZDELITEV PODATKOV	36
4.2 KORELACIJA MED CEA IN CA 19-9.....	39
4.3 PRIMERJAVA SREDNJIH VREDNOSTI MED SKUPINAMA A IN B	40
4.4 RAZLIKE KONCENTRACIJ CEA IN CA 19-9 GLEDE NA LOKACIJO TUMORJA	41
4.5 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST CA 19-9	43
4.6 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST CEA	44
4.7 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST CEA IN CA 19-9.....	46
4.8 SPECIFIČNOST IN OBČUTLJIVOST PRI UPOŠTEVANJU POVIŠANEGA CEA ALI CA 19-9	47
5. RAZPRAVA	48
6. ZAKLJUČEK.....	52
8. LITERATURA	53
7. PRILOGA.....	58

KAZALO SLIK

Slika 1: Histološki prerez trebušne slinavke (53).....	2
Slika 2: Komplet reagentov	18
Slika 3: Kontrolni material	18
Slika 4: Kalibratorji.....	18
Slika 5: Akridinijev sulfonamid (23).....	21
Slika 6: Optični sistem aparata ARCHITECT (27).....	25
Slika 7: Občutljivost, specifičnost testa.....	31

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: TNM-klasifikacija	12
Preglednica II: Kontingenčna tabela.....	31
Preglednica III: Statistični parametri skupine A in B pri CEA.....	35
Preglednica IV: Statistični parametri skupine A in B pri CA 19-9	36
Preglednica V: Kolmogorov- Smirnov test vzorca A in B.....	37
Preglednica VI: Spearmanov koeficient korelacije.....	39
Preglednica VII: Rangiranje podatkov	40
Preglednica VIII: Mann-Whitney U- in Wilcoxon W-test.....	40
Preglednica IX: Kruskal-Wallis test	41
Preglednica X: Rangiranje podatkov pri Kruskal-Wallis testu	42
Preglednica XI: Kontingenčna tabela CA19-9	43
Preglednica XII: Površina roc krivulje CA 19-9.....	43
Preglednica XIII: Kontingenčna tabela CEA	43
Preglednica XIV: Površina ROC krivulje CEA.....	45
Preglednica XV: Kontigenčna tabela CEA in CA 19-9.....	45
Preglednica XVI: Površina ROC krivulj CEA in CA 19-9	45
Preglednica XVII: Kontigenčna tabela pri upoštevanju povišanega CA 19-9 ali CEA.....	47
Preglednica XVIII: Primerjava specifičnosti, občutljivosti, PNV, NNV	48

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Gausova porazdelitev.....	27
Graf 2: ROC krivulja	34
Graf 3: Porazdelitev podatkov CEA skupine B.....	37
Graf 4: Porazdelitev podatkov CA 19-9 skupine A	38
Graf 5: Porazdelitev podatkov CA 19-9 skupine B.....	38
Graf 6: Porazdelitev podatkov CEA v skupini A.....	39

Graf 7: ROC krivulja CA 19-9.....	43
Graf 8: ROC krivulja CEA.....	45
Graf 9: ROC krivulja CEA in CA 19-9	46

POVZETEK

Trebušna slinavka (*pancreas*) je pomemben del gastrointestinalnega trakta z endokrino in eksokrino funkcijo. Rak trebušne slinavke je eden izmed najbolj malignih in invazivnih tumorjev, zato je tudi eden izmed najpogostejših vzrokov smrti zaradi malignoma. Pri raku trebušne slinavke je značilna zelo slaba prognoza in preživetje bolnikov. Problem uspešnega zdravljenja predstavlja pozno odkritje bolezni. Zaradi nespecifične simptomatike je rak najpogosteje odkrit v invazivni napredovali fazi, ko rak že metastazira v sosednje organe. Najpogosteje zajame pljuča in jetra.

V nalogi smo poskušali ovrednotiti diagnostično vrednost določitve dveh tumorskih označevalcev, karcinoembrionalnega antigena (CEA) in karbohidratnega antigena 19-9 (CA 19-9) pri bolnikih z rakom trebušne slinavke. CEA in CA 19-9 sta še vedno kljub omejeni specifičnosti in občutljivosti najbolj pogosto uporabljena tumorska označevalca v klinični praksi pri raku trebušne slinavke. V serumu bolnikov z že postavljenimi diagnozo raka na trebušni slinavki in pri osebah brez bolezni smo kvantitativno določali koncentracije CEA in CA 19-9. CEA in CA 19-9 smo določili s pomočjo monoklonskih protiteles po principu dvostopenjske imunokemijske reakcije. Iz dobljenih meritev smo izračunali občutljivost in specifičnost, pozitivno napovedno vrednost (PNV) in negativno napovedno vrednost (NNV). S pomočjo računalniškega programa za obdelavo statističnih podatkov (SPSS) smo naredili ROC krivulje za vsak posamezen tumorski označevalec in krivuljo za oba tumorska označevalca skupaj. Iz rezultatov smo ugotovili, da je uporaba CEA in CA 19-9 pri obolelih diagnostično pomembna. CA 19-9 se je izkazal kot zanesljivejši tumorski označevalec od CEA, z boljšo občutljivostjo in specifičnostjo. CEA in CA 19-9 sta se izkazala neprimerna kot samostojna tumorska označevalca pri raku trebušne slinavke v presejalni diagnostiki. Pri upoštevanju obeh, CEA in CA 19-9 se diagnostična občutljivost in specifičnost tumorskih označevalcev izboljšata. AUC se je pri kombinirani uporabi obeh tumorskih označevalcev zvišal na 0,917.

Ključne besede: rak trebušne slinavke, CEA, CA 19-9, občutljivost, specifičnost

SUMMARY

Pancreas is an important part of the gastrointestinal tract with endocrine and exocrine function. Pancreatic cancer is one of the most malignant and invasive tumors, and is also one of the most common causes of death from malignancy. In the case of pancreatic cancer it is characterized by a very poor prognosis and survival of patients. The problem of successful treatment represents a late detection of the disease. Due to the nonspecific symptomatology cancer it is the most commonly detected already in invasive advanced stage when the cancer has metastasized into neighboring organs, most frequently lungs and liver. In our work we have tried to evaluate the diagnostic value of determination of two tumor markers, carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9) in patients with pancreatic cancer. The use of CEA and CA 19-9 is still limited despite their high specificity and sensitivity in cancer of the pancreas. In the serum of patients already diagnosed with pancreatic cancer and in those without the disease we determined quantitatively the concentration of CEA and CA 19-9. CEA and CA 19-9 were determined using monoclonal antibodies according to the principle of two-stage immunochemical reaction. From the measurements obtained, we calculated the sensitivity and specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV). By using SPSS computer program we made the ROC curve for each individual tumor marker and the curve for both tumor markers together. From the results, we found that the use of CEA and CA 19-9 in diseased has a diagnostic meaning. CA 19-9 has proved to be more reliable tumor marker as CEA, with improved sensitivity and specificity. CEA and CA 19-9 have proved inadequate as a separate tumor marker for the screening pancreatic cancer. When taking both, CEA and CA 19-9, the diagnostic sensitivity and specificity improved. AUC has increased when we combined both tumor markers. AUC increased to 0,917.

Key words: pancreatic cancer, CEA, CA 19-9, sensitivity, specificity

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

APC: antigen predstavitvena celica

AKT: protein kinaza B

ACH: acetilholin (IUPAC: 2-Acetoksi-*N,N,N*-trimetiletanamonijev)

CA 19-9: karbohidratni antigen 19-9

CEA: karcinoembrionalni antigen

CT: računalniška tomografija

CMIA: kemiluminiscenčna imunotehnika z mikrodelci

EGFR: receptor epidermalnega rastnega faktorja

ERCP: endoskopska retrogradna holangiografija

GRP: gastrin sproščujoči peptid

5-HT: 5- hidroksitriptamin (IUPAC: 3-(aminoetil)-indol-5-ol)

LN: lažno negativen

LP: lažno pozitiven

LR+: razmerje obetov za pozitiven test

LR.: razmerje obetov za negativen test

MRA: magnetno resonančna angiografija

MRCP: magnetno resonančna holangiopankreatografija

NET: nevroendokrini tumorji

NNV: negativna napovedna vrednost

NF- κ B: jedrni faktor pomnoževanja lahke kappa verige aktiviranih B-celic

PP: pankreatični polipeptid

PTSI: pankreatični sekretorni tripsinski inhibitor

PTC: perkutana transhepatična holangiografija

PNV: pozitivna napovedna vrednost

PET: pozitronska emisijska tomografija

RP: resnično pozitiven

RN: resnično negativen

RLU: relativne svetlobne enote

SPN: solidna psevdopapilarna neoplazma (angl.: Solid pseudopapillary neoplasm)

SRS: scintigrafija somatostatinskega receptorja

TS: trebušna slinavka

TO: tumorski označevalec

TGF: tumor rastni faktor

UV: ultrazvok

VIP: vazoaktivni intestinalni polipeptid

1. UVOD

1.1 TREBUŠNA SLINAVKA

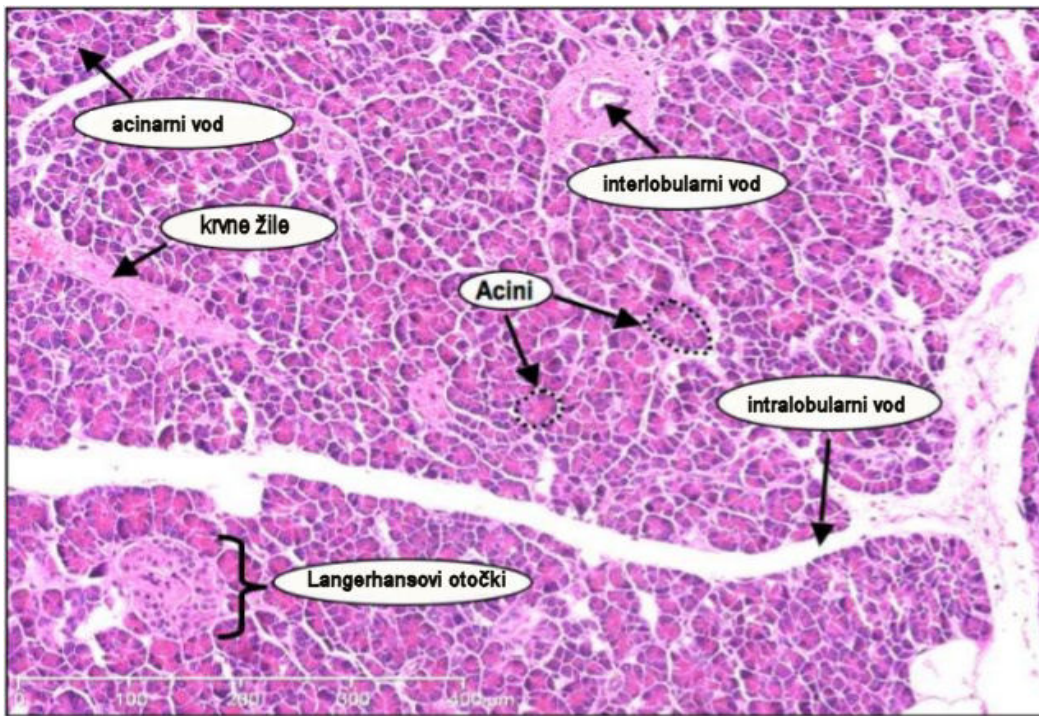
1.1.1 ANATOMIJA IN HISTOLOGIJA TREBUŠNE SLINAVKE

Trebušna slinavka (*pancreas*) je endokrina in eksokrina žleza v trebušni votlini. Je pomemben del prebavnega trakta, dolga je 12 do 15 cm in tehta do 120 g. Leži v retroperitonealnem predelu za želodcem v krivini dvanajstnika. Najširši del trebušne slinavke je sestavljen iz glave, ki leži na desni strani trebušne votline, kjer jo obdaja dvanajstnikova medialna stena. Ožji del trebušne slinavke predstavlja vrat in telo, ki se nadaljuje v rep in sega do vranice (1, 2).

Približno 85 % tkiva trebušne slinavke je iz eksokrinega dela. Eksokrini del je sestavljen iz acinusov, ki so iz acinarnih in duktularnih celic. Acinarne celice imajo v apikalnem predelu številna sekretorna zimogena zrnca. Več acinusov se poveže v višjo funkcionalno enoto lobus. Lobusi so povezani z vezivnim tkivom septa, kjer so tudi številne kapilare, živčni končiči, limfatični in sekrecijski vodi. Acinusi prehajajo preko intraacinarne vstavke v interlobularne vode in ti se nadaljujejo v večje intralobularne vode, ki se zlivajo v glavni vod trebušne slinavke (1, 2, 3).

Glavni pankreatični vod (*Wirsungov vod*) se začne blizu repa, poteka po sredini telesa trebušne slinavke in sega do glave trebušne slinavke. Pri glavni žolčni papili se združi z žolčnim vodom v skupni vod (*ampulla Vateri*) in se skozi medialno steno dvanajstnika izliva v dvanajstnik. Trebušna slinavka ima lahko tudi pomožen vod oziroma *Santorinijev vod*, ki je prisoten pri 70 % ljudi in je delno zakrnel. Poteka nad žolčnim vodom in se izteka v malo žolčno papilo nad veliko žolčno papilo (*Vaterjeva papila*) (1, 3).

Endokrini del tkiva trebušne slinavke sestavljajo Langerhansovi otočki, ki se nahajajo med acinusi ali lobusi. Otočke sestavljajo štirje glavni tipi celic, ki se med seboj razlikujejo po njihovi endokrini funkciji. To so celice A, ki izločajo glukagon, celice B izločajo insulin, celice D izločajo somtostatin in PP celice, ki izločajo pankreatične polipeptide (1, 3, 4).



Slika 1: Histološki prerez trebušne slinavke (53)

1.1.2 FIZIOLOGIJA TREBUŠNE SLINAVKE

1.1.2.1 EKSOKRINA FUNKCIJA

S prebavnimi encimi se preko sistema izvodil dnevno v dvanajstnik izloči 1,5 do 3 litre soka trebušne slinavke. Izločanje tekočine z natrijevim karbonatom iz dukturalnih celic vzdržuje ustrezen pH v dvanajstniku. Nevtralizacija soka trebušne slinavke zagotovi optimalne pogoje za delovanje prebavnih encimov in žolča ter zaščiti žolčno sluznico pred peptično digestijo (2, 4).

Acinarne celice izločajo proteolitične encime (tripsin, himotripsin...), lipolitične encime (lipaza) in amilolitične encime (amilaza). Skladiščeni so v zimogenih zrnih v obliki proencimov in se aktivirajo šele v dvanajstniku, razen amilaze in lipaze, ki sta aktivna encima že v pankreatičnem soku. Na površini acinarnih celic se nahajajo receptorji za neurotransmitorje (ACH, GRP, VIP), ki vplivajo na izločanje encimov in verjetno tudi na njihovo sintezo (2, 4).

Eksokrina funkcija je regulirana z avtonomnim živčevjem in dvema glavnima hormonoma, sekretinom in holecistokininom, ki spodbujata izločanje in rast eksokrinih celic. Sekretin

stimulira dukturalne celice k izločanju soka trebušne slinavke z visoko koncentracijo hidrogenkarbonata. Njegovo izločanje iz dvanajstnika je spodbujeno s kislinami. Izločanje holecistokinina iz dvanajstnika in jejunuma spodbudijo peptidi, aminokisliline in maščobne kisline. Holecistokinin stimulira acinarne celice k izločanju prebavnih encimov (2, 5, 6).

Glavni zaviralci izločanja soka trebušne slinavke so: somatostatin, neuropeptid Y in peptid YY. Somatostatin deluje zaviralno na holecistokinin in sekretin ter zavira izločanje polipeptida trebušne slinavke. V acinusih pa so tudi zaviralci proteaz, kot je PTSI (sekretorni tripsinski inhibitor trebušne slinavke), ki prepreči znotraj celično in zunajcelično aktivacijo tripsina in tako varuje žlezo pred avtodigestijo. Avtodigestijo trebušne slinavke prepreči tudi spontana intrapankreatična sprostitvev tripsina, kar vodi v aktivacijo encimov, ki razgradijo proteolitične encime v zimogenih zrnih trebušne slinavke (2, 6, 7).

1.1.2.2 ENDOKRINA FUNKCIJA

Iz Langerhansovih otočkov se izločajo hormoni polipeptidne narave kot so: inzulin, glukagon, somatostatin in polipeptid trebušne slinavke. Inzulin z anabolno funkcijo in glukagon s kataboličnim učinkom imata pomembno vlogo pri uravnavanju presnove ogljikovih hidratov, beljakovin in lipidov (3, 8).

Fiziološka vloga polipeptida trebušne slinavke (PP) ni povsem jasna. Njegovo izločanje je povečano pri endokrinih tumorjih trebušne slinavke (glukagonom tumorji, VIP-om tumorji, tumorji F celic) (8).

1.1.3. BOLEZNI TREBUŠNE SLINAVKE

1.1.3.1 RAZVOJNE ANOMALIJE

Nastanejo v času embrionalnega razvoja. Imamo več vrst anomalij, kot so:

- abertarni ali akcesorni pankreas (pankreatično tkivo je zunaj trebušne slinavke),
- anularni pankreas (pankreatično tkivo obdaja dvanajstnik v obliki prstana),
- pankreas divizum (dorzalna in ventralna zasnova TS se nepravilno združi),
- kongenitalne ciste TS (z epitelijem obdane votline, napolnjene s serozno tekočino) (2).

1.1.3.2 AKUTNI PANKREATITIS

Vnetje traja manj kot tri tedne. Nastane zaradi neprimerne aktivacije intrapankreatičnih encimov, katere posledica je avtodigestija žleze in vnetje. Pri hudem vnetju lahko pride do nekroze acinarnih celic. Vzroki nastanka so lahko: zapora vodov (biliarni pankreatitis pri žolčnih kamnih), alkoholizem, genetske okvare (hereditarni pankreatitis), tumorji, hiperkalcemija in hiperparatiroidizem (2).

1.1.3.3 KRONIČNI PANKREATITIS

Povzroči obsežne morfološke in funkcionalne spremembe. Poteka lahko asimptomatsko ali pa so vidni znaki motnje eksokrine in endokrine funkcije žleze. Pri napredovali bolezni pride do eksokrine in endokrine insuficience žleze (sladkorna bolezen). Vzroki nastanka so lahko: alkohol, diabetes, maldigestija, genetski dejavniki (cistična fibroza), zoženje ali zapora voda trebušne slinavke (2).

1.1.3.4 RAK TREBUŠNE SLINAVKE

V Sloveniji je rak na trebušni slinavki pogosto obolenje in je eden izmed najpogostejših malignomov prebavil. Obolevnost je pri moških približno dvakrat pogostejša kot pri ženskah. Običajno se bolezen pojavlja pri osebah, starejših od 50 let. Ima visoko stopnjo malignosti in je četrti najpogostejši vzrok smrti zaradi malignoma. Zgodnji znaki bolezni so zelo nejasni in nespecifični, kar predstavlja težave pri zgodnji diagnostiki. Značilni klinični simptomi, kot so bolečina v zgornjem delu trebuha, zlatenica in hujšanje, se pojavijo, ko je bolezen že napredovala. Prognoza bolezni je zaradi pozne diagnostike zelo slaba. Kar 8% bolnikov je diagnosticiranih v stadiju bolezni, ko je tumor že razširjen na sosednje organe. Rak trebušne slinavke je zelo invaziven tumor in hitro zajame retroperitonej in regionalne bezgavke. Petletno preživetje po odstranitvi tumorja je manj kot 20 % (2, 8).

1.1.4 KANCEROGENEZA

Ko se celice začnejo nenormalno in nenadzorovano razraščati v maso celic ali v tkiva brez prave funkcije, nastane tumor ali neoplazma. Celice tumorja pridobijo lastnost razsejanja po telesu in nastane bolezen-rak. Do nastanka neoplazemskih celic pride zaradi sprememb genoma predvsem v sistemih fiziologije celic, kot so: nadzor celičnega ciklusa, uravnavanje transkripcije, popravljalni mehanizmi DNK, nadzor apoptoze in medcelična komunikacija. Premagani so mehanizmi, ki ohranjajo integriteto genoma in imunski

sistem. Rakave celice se torej funkcionalno razlikujejo od zdravih. Imajo spremenjeno rast, značilna je nesmrtnost celice zaradi zvišane aktivnosti encima telomeraze, ki preprečuje krajšanje telomer. Imajo avtonomno uravnavanje celičnega cikla in so avtokrinohomeostatično neodvisne celice. Gibljivost celic je večja zaradi zmanjšane kontaktne inhibicije med celicami, ki nastane zaradi spremenjene strukture citoskeleta. Spremenjena je presnova rakavih celic zaradi povečanega anabolizma celic. Zaradi izgube ali mutacije encimov popraviljanja DNK so rakave celice nesposobne oziroma imajo zmanjšano sposobnost popraviljanja poškodb (10, 11).

Pri kancerogenezi imajo pomembno vlogo onkogeni. Nastanejo iz protoonkogenov pri mutaciji genov v regulatornem ali v strukturnem delu gena in pridobijo funkcijo na dominanten način. Kadar se onkogeni aktivirajo pri točkovnih mutacijah in delecijah, nastane hiperaktivni protein. Pri aktivaciji onkogenega z gensko amplifikacijo pride do presežka normalnega proteina. Pri kromosomskih preureditvah ali fuziji gena pa nastanejo nenormalni produkti normalnega proteina ali novi proteini (10, 11).

Produkti onkogenov so:

- rastni dejavniki (povečana transkripcija-mutacija *RAS* poveča izločanje TGF),
- membranski receptorji (stalna aktivnost, pomnožitev receptorjev),
- citoplazemski signalni proteini
- transkripcijski dejavniki (mutacije, ki v jedru uravnavajo transkripcijo genov in vodijo v neoplazijo in povzročijo prekomerno izražanje genov) (10, 11).

Pri kancerogenezi imajo pomembno nalogo tudi tumor zavirajoči geni, ki so v normalnih razmerah odgovorni za uravnavanje zaviranja celične delitve. Do izgube funkcije tumor zavirajočega gena pride na recesiven način. Potrebni sta mutaciji na obeh alelih (10).

Produkti tumor zavirajočih genov so:

- molekule signalnih poti v citoplazmi (nevrofibromin-1 akcesorni Ras protein GTP-aze, APC, ki vpliva na dostopnost transkripcijskega faktorja),
- molekule, ki uravnavajo transkripcijo (geni *BRCA*, ki so vpleteni v popravilo DNK) (10, 11).

Pri nastanku neoplazme imajo poleg onkogenov in tumor zavirajočih genov pomembno vlogo tudi geni apoptoze, kot na primer gen *BCL-2*. Prekomerno namnoženi geni *BCL-2* zavirajo apoptozo in tako ugodno vplivajo na preživetje celic z mutiranimi geni (10, 11).

V času procesa kancerogeneze celice dosežejo sposobnost nekontrolirane rasti, heterogenost, sposobnost invazije in metastaziranja. Invazivnost vključuje oddaljevanje celic od mase, vezavo celic na zunajcelični matriks, razgradnjo zunajceličnega matriksa (kolagenaza IV, katepsini, heparanaza...), migracijo celic, vstop skupkov v žile in adhezijo na oddaljenih mestih od primarnega tumorja. Pri metastaziranju po ekstravazaciji nastajajo sekundarni zasevki in se širijo po žilah ter sidrajo na površino žil. Zmožnost metastaziranja tumorjem poveča možnost preživetja tumorskih celic in poveča odpornost celic proti apoptozi. Zagotovljeni morajo biti pogoji metastaziranja, kot so: tumorski žilni sistem (angiogeneza tumorja), zunajcelični matriks ter tumorsko mikrookolje (10, 11).

1.1.4.1 PATOGENEZA RAKA TREBUŠNE SLINAVKE NA MOLEKULARNEM NIVOJU

Do izpodbujene kancerogeneze TS in napredovanja raka TS pride zaradi aktivacije onkogenov in izključitve tumor zavirajočih genov. Pri celični signalizaciji tumorja TS je spremenjena regulacija molekul (EGFR, AKT, NFκ-B). Pri 90 % obolelih za rakom trebušne slinavke pride do aktivacije *KRAS* onkogenega. *KRAS* geni kodirajo nastanek na membrano vezanega proteina, ki ima glavno vlogo pri celični signalni poti rastnih faktorjev. Sodeluje tudi pri celični proliferaciji in migraciji. Točkovna mutacija privede do kontinuirane aktivacije *KRAS* onkogenega, signalne poti so ves čas stimulirane, kar povzroči nekontrolirano celično rast (12).

S kancerogenezo TS so v raziskavah povezovali tudi onkogenega COX-2 in Notch gen. Notch gen se poveže s transkripcijskim jedrnim faktorjem NF-κB, ki uravnava izražanje genov in vpliva na sposobnost preživetja celic. Aktivnost NF-κB se ob vezavi na Notch gena močno zviša (8). Imunohistokemične študije so dokazale, da je 47–66 % tumorjev TS imelo povišano izražanje COX-2, kar povzroči povečano tvorbo prostaglandinov in posledično stimulacijo celične rasti (8).

Potrdili so tudi ostale onkogene, kot so: Akt-2, Src, Bcl6, S100P, Cyclin D1, ki so vpleteni v razvoj in širjenje tumorja trebušne slinavke (8, 12).

Pomembni tumor zavirajoči geni pri raku trebušne slinavke so: p16, p53, SMAD4, PTEN, p16INK4a/*CDKN2A*, DPC4 (8, 12).

Pri raku trebušne slinavke je p16 neaktiviran pri 95 % zbolelih. Gen p16 zavira celično rast preko G1/S prehoda z inhibicijo ciklina D in CDK4 (fosforilizacija retinoblastoma) (12).

1.1.4.2 DEJAVNIKI TVEGANJA RAKA TREBUŠNE SLINAVKE

Dejavniki tveganja, na katere lahko vplivamo, so: kajenje, debelost, izpostavljenost določenim kemičnim topilom.

Dejavniki, na katere ne moremo vplivati, so:

- 1. Demografski dejavniki:** spol (moški imajo 30 % več možnosti za razvoj raka kot ženske), starost (večina obolelih je starejših od 45 let), rasa (pogosteje oboleva črnska populacija) (13, 14).
- 2. Genetski dejavniki:**
 - podedovani rak na prsih in rak jajčnikov, ki ga povzroča mutacija gena *BRCA*
 - melanom v družini povzročen z mutacijo gena p16/*CDKN2A*
 - pancreatitis v družini povzročen z mutacijo gena *PRSS1*
 - dedni nepolipozni kolorektalni rak (HNPCC), povzročen z napako na genu *MLN1* ali *MSH2*
 - Peutz-Jaghers sindrom (PJS) je povzročen z okvaro na genu *STK11*
 - Nevroendokrini tumorji, ki so posledica genetskih sprememb: nevrofibromatoza povzročena z mutacijo gena *NF1*, multipla endokrina neoplazija tipa 1 (*MEN1*) povzročena z mutacijo gena *MEN1* (14, 15).
- 3. Bolezenska stanja:** diabetes (bolj pogost pri ljudeh z diabetesom tipa 2), kronični pankreatitis, ciroza jeter, težave z želodcem (14, 15).

1.1.5 EKSOKRINI TUMORJI TREBUŠNE SLINAVKE

Kar 95 % malignih tumorjev TS izvira iz eksokrinega dela trebušne slinavke. Imamo več vrst eksogenih tumorjev. **Adenokarcinom** je pogost eksogeni tumor, ki se večinoma razvije iz dukturalnih celic. Tumor acinarnega izvora oziroma **acinarni celični karcinom** je redkejši eksokrini tumor trebušne slinavke. Le 1 % eksokrinih tumorjev je **neepitelijskega izvora**. Eden izmed manj pogostih tumorjev, ki se z razliko od ostalih tumorjev TS širi počasi in ima dobro prognozo je **SPN** (*solidna psevdopapilarna neoplazma*) **tumor**. Med eksokrine karcinome spadajo tudi **karcinomi ampulla Vateri**, ki pogosto zaprejo prehod žolčevoda, zato se lahko za razliko od drugih zelo hitro diagnosticirajo, saj je zlatenica eden izmed prvih zgodnjih simptomov raka. Za večino eksokrinih tumorjev je značilno, da se hitro širijo, najpogosteje v jetra in pljuča, zajamejo lahko tudi dvanajstnik, želodec in področne bezgavke. Karcinom TS se širi perinevralno in limfogeno (13, 14, 15).

1.1.5.1 SIMPTOMI EKSOKRINIH TUMORJEV TREBUŠNE SLINAVKE

So zelo nespecifični in odvisni od lokacije tumorja (glava, telo, rep trebušne slinavke). Značilna in pogosta je neprijetna **bolečina** v trebuhu, ki se lahko širi v predel hrbta. Ostali značilni simptomi pri raku TS so:

- **Zlatenica:** prisotna je pri 50 % obolelih z rakom trebušne slinavke. Znaki zlatenice se poleg rumene in srbeče kože opazijo tudi v urinu (temen urin) in blatu (bledo blato). Zlatenica nastane zaradi zapore žolčevodov, ki jo povzroči rastoči tumor in posledičnega zastajanja bilirubina v telesu.
- **Izguba telesne teže:** zaradi raka je lahko zvečana produkcija prebavnih encimov, kar posledično vodi v zmanjšan izkoristek hranil in hujšanje. Hujšanje je značilno predvsem pri raku na glavi trebušne slinavke.
- **Steatoreja:** smrdeče bledo blato z neprebavljeno maščobo, se pojavi zaradi spremenjenega izločanja encimov, potrebnih za presnovo maščob.
- **Slabost in bruhanje:** vzrok je lahko zaradi zapore žolčevodov ali pritiska tumorja na dvanajstnik, kar vodi do biokemičnega neravnovesja v telesu in slabosti.
- **Vročina:** nastopi, kadar tumor povzroči vnetje trebušne slinavke ali blokado vodov.

- **Diabetes:** nastopi, kadar tumor prizadene endokrino funkcijo trebušne slinavke. Pogost je pri starejših ljudeh, obolelih za rakom na trebušni slinavki (14, 15).

1.1.6 ENDOGENI TUMORJI TREBUŠNE SLINAVKE IN SIMPTOMI

Endogeni tumorji so manj pogosti in so poimenovani kot **nevroendokrini tumorji TS (NET)** ali celični tumorji otočkov. Prognoza NET-tumorjev TS je običajno boljša od prognoze eksokrinih tumorjev. Večina teh tumorjev je funkcionalnih, saj izločajo svoje lastne hormone v krvni obtok (14). Glede na njihovo izločanje se delijo v več skupin, kot so:

- **Gastrinom:** tumor celic, ki izločajo gastrin. Povečano izločanje gastrina povzroča peptični ulkus v želodcu ali dvanajstniku. Značilni simptomi so lahko huda bolečina, črno katranasto blato in driska.
- **Insulinom:** tumor B-tipa celic, ki izločajo inzulin. Povečana proizvodnja inzulina lahko vodi do hipoglikemije posledično pride do slabosti, potenja, omotice.
- **Glukagonom:** tumor A-tipa celic, ki izloča glukagon. Povečana koncentracija glukagona povzroča kožne izpuščaje, hujšanje.
- **Somatostatinom:** tumor celic F, ki izločajo somatostatin. Povišan somatostatin povzroči nastanek žolčnih kamnov, diabetes, drisko, steatorejo.
- **VIP-omi:** tumor celic, ki izloča vazoaktivni intestinalni peptid, kar povzroči naslednje simptome: vodeno drisko, visok krvni tlak, pordeli obraz.
- **PP-om:** tumorji, ki izločajo pankreatični polipeptid.
- **Nefunkcionalni tumorji:** ne izločajo hormonov in zato ne presežejo koncentracije hormonov, ki bi povzročili spremembe. Simptomi so zato nespecifični. Bolečina in zlatenica se pojavita, ko je tumor že razširjen, diagnosticiranje bolezni je zelo pozno.
- **Karcinoidni tumorji:** izločajo serotonin (5HT) in njegov prekurzor 5-HTP. Simptomi se pojavijo šele, ko se je rak razširil izven trebušne slinavke. Najpogosteje se razširi v jetra, kjer tumorske celice izločajo hormone v kri, ki prihaja iz jeter. Pojavi se karcinoidni sindrom (rdečica, driska, povišan srčni utrip, sopenje) (14, 15).

1.1.7 DIAGNOSTIKA RAKA TREBUŠNE SLINAVKE

Tipični značilni znaki se pojavijo zelo pozno, bolezen je zelo težko odkriti v začetni razvojni stopnji. Zdravnik najprej naredi **anamnezo**: življenjske navade bolnika, težave bolnika, zgodovina bolezni ipd. Opravi se **fizični pregled** bolnika (barva kože, beločnic, tipanje trebušnega predela oziroma lokacija bolečine...) (14, 15). Ostale preiskave, ki vključujejo obravnavo bolnika so:

- **Laboratorijski testi:** običajno je povišan predvsem direktni bilirubin zaradi neprehodnosti skupne pankreatične in žolčne poti. Zvišani so lahko lipaza in jetrni encimi (2, 14, 15).
- **UZ-trebuha:** pregled je le orientacijski, potrebne so nadaljnje preiskave, ki so natančnejše in zanesljivejše (14, 15, 17).
- **Računalniška tomografija (CT):** odkrijejo se tumorji, ki so večji od 2 cm. Princip temelji na absorpciji ionizirajočega sevanja X-žarkov v tkiva. Naredijo se serije slikovnih posnetkov, ki se računalniško obdelajo. Z uporabo kontrastnega sredstva so slike še bolj natančne in vidljive. S pomočjo CT-vodenja se lahko naredi tudi igelna biopsija tkiva (15, 17, 18).
- **Endoskopski ultrazvok (EUZ):** omogoča bolj natančen strukturni pregled, pokaže tumorje, manjše od 2 cm, tudi morebitno infiltracijo portalne vene in arterij. Vidna je konfiguracija vodov trebušne slinavke in žolčevodov, hkrati pa omogoča tudi odvzem tumorske mase za histološki pregled (14, 15).
- **ERCP:** z endoskopsko kamero se lahko vidi »*ampulla Vateri*« in žolčni vodi. ERCP-tehnika omogoča biopsijo. Injicira se kontrastno sredstvo in naredi CT (14, 15).
- **Magnetna resonanca:** s pomočjo jeder v magnetnem polju nastane dvodimenzionalna ali tridimenzionalna slika, ki ima še boljši kontrast od CT-tehnike. Pri sumu na rak TS se naredi MRCP oziroma pregled pankreatičnih in žolčnih vodov in MRA-angiografija, kjer se vidi ožilje (14, 15).
- **PTC:** z iglo se skozi trebušno steno v žolčevod injicira neinvazivno kontrastno sredstvo in se naredi CT. Preiskava omogoča biopsijo tkiva (14).

- **SRS:** uporablja se pri diagnostiki neuroendokrinih tumorjev (NET). Temelji na vezavi sintetizirane radioaktivno (indij-111) označene spojine na tumorske NET celice (15).
- **PET slikanje:** uporabljajo se radioaktivnih snovi oziroma označevalci za odkrivanje aktivnosti v tkivih. Slika je slabša od CT in MR, vendar lahko poda koristne informacije o delovanju organov in celem telesu (14, 15).
- **Molekularna diagnostika:** pri 90 % primerov tumorjev trebušne slinavke je izražena mutacija onkogenega *KRAS* in supresorskega gena *DPC4* (2).

1.1.8 ZDRAVLJENJE RAKA TREBUŠNE SLINAVKE

Pri izbiri zdravljenja je pomembna določitev stopnje razvoja oziroma stadij tumorja. To se lahko določi že med diagnosticiranjem (CT, EUZ, ERCP...) ali med operacijo tumorja (14). Rak trebušne slinavke se klasificira glede na lokacijo, glede na razširjenost tumorja in glede na vpliv tumorja na delovanje ostalih organov. Pri operaciji se tumor tekom nje opredeli s pomočjo ameriškega TNM-klasifikacijskega modela, kjer se upošteva lokacija in velikost tumorja (T), prisotnost zasevkov (N) in metastaziranje tumorja v druge organe (M) (15).

Preglednica I: TNM-klasifikacija

STADIJ RAKA	OPIS STADIJA
STADIJ 0 (Tis, N0, M0)	Tumor je omejen na zgornje plasti dukturnih celic TS in ni razširjen izven trebušne slinavke
STADIJ IA (T1, N0, M0)	Tumor je omejen na trebušno slinavko, velik je 2 cm ali manjši (T1). Ni razširjen v sosednje bezgavke (N0) ali v bližnjo okolico (M0).
STADIJ IB (T2, N0, M0)	Tumor je omejen na trebušno slinavko in je večji od 2 cm (T2). Ni razširjen v sosednje bezgavke (N0) ali v bližnjo okolico (M0).
STADIJ IIA (T3, N0, M0)	Tumor se širi izven TS, vendar ne v glavno ožilje in živce (T3). Ni razširjen v sosednje bezgavke (N0) ali oddaljeno okolico (M0).
STADIJ IIB (T1-3, N1, M0)	Tumor je omejen na TS ali se širi izven TS, vendar ne zajame glavnega ožilja in živcev (T1-T3). Razširjen je v sosednje bezgavke (N1), vendar ne v oddaljeno okolico (M0).
STADIJ III (T4, N, M0)	Tumor se širi izven TS v sosednje ožilje in živce (T4). Ni nujno, da je razširjen v sosednje bezgavke. Ni razširjen v oddaljeno okolico.
STADIJ IV (T, N, M1)	Tumor se je razširil v oddaljeno okolico.

Možnosti terapije tumorja TS so: operativna odstranitev tumorja, kemoterapija, tarčna terapija in radiacijska terapija. Operativni poseg je lahko izbira terapije v zgodnjem stadiju raka. Odstrani se lahko samo prizadeti del trebušne slinavke ali celotna slinavka z bližnjimi organi (dvanajstnik, skupni žolčevod, del želodca, žolčnik). Paliativni kirurški posegi, ki se opravijo pri raku TS so: bilodigestivne anastomoze pri zlatenici, gastroenteroanastomoze pri zapori dvanajstnika (14, 15).

Kemoterapija se lahko uporablja v vsakem stadiju bolezni, pred operacijo ali v kombinaciji z radiacijsko terapijo. Predvsem pride v izbor pri raku, ki je že preveč razširjen, da bi ga odstranili (14).

Terapija s tarčnim delovanjem v kombinaciji s kemoterapijo zavira rast tumorja in njegovo širjenje. V mnogih raziskavah so proučevali razlike zdravih celic TS od rakavih celic in na ta način poskušali najti zdravila, ki bi delovala na specifične tarčne molekule v tumorju. Tarčna zdravila lahko delujejo na EGFR (erlotinin v kombinaciji z gemcitabinom), na angiogenezni faktor, kar povzroči izstradanje tumorja in na podporno tkivo tumorja. Preizkušajo mnogo tarčnih zdravil, ki lahko delujejo tudi na več različnih tarč hkrati (19).

Imunska terapija spodbudi celice imunskega sistema, da delujejo uničujoče na celice tumorja (monoklonska protitelesa, tumorska cepiva, ki povečajo imunski odgovor na tumorske celice). Uporabljajo se tudi zdravila, ki delujejo tarčno na imunske kontrolne točke (8).

Zdravljenje se pogosto kombinira z radiacijsko terapijo, kjer se uporabljajo visokoenergijski žarki, ki ubijajo rakave celice (17, 18).

1.2 TUMORSKI OZNAČEVALCI

Tumorski označevalci so lahko na novo sintetizirane snovi, ki nastanejo pod vplivom tumorja ali snovi v drugih celicah, ki nastanejo pod vplivom maligno spremenjene celice. V organizmu so lahko normalno prisotne snovi, vendar v precej nižjih koncentracijah. Tumorski označevalci so lahko membranski antigeni, hormoni, encimi, poliamini, nukleozidi, produkti onkogenov ali produkti tumorskih supresorskih genov. Merijo se v serumu, plazmi ali drugih telesnih tekočinah (19).

V klinični onkologiji so manj primerni pri ugotavljanju primarnega tumorja. Uporabljajo se predvsem za spremljanje bolezni pred zdravljenjem, med njim in po njem, ocenitvi malignosti bolezni in ugotavljanju ponovitve bolezni. So v pomoč pri izbiri načina zdravljenja. Uporabljajo se lahko kot pomoč pri zdravljenju, kjer se uporabijo receptorji specifičnih označevalcev kot vezavna mesta za zdravila, citotoksičnih celic ter toksinov radioaktivnih izotopov (19, 20).

1.2.1 VREDNOTENJE TUMORSKIH OZNAČEVALCEV

Pri vrednotenju rezultatov se morajo upoštevati tudi pomanjkljivosti do sedaj znanih označevalcev. Upoštevati je treba njihovo občutljivost in specifičnost pri določeni maligni bolezni. Tumorski označevalci se v visokih koncentracijah lahko tvorijo tudi pri nemalighnih procesih (vnetja, bolezni jeter, trebušne slinavke) in različnih fizioloških stanjih (nosečnost, laktacija, menstruacija) (19, 20).

Pomen in zanesljivost TO pri določeni bolezni se opredeli predvsem s pomočjo izračuna občutljivosti in specifičnosti TO.

Idealen TO naj bi imel 100-odstotno občutljivost in specifičnost. Da bi dosegel 100-odstotno občutljivost in specifičnost, bi moral zadostiti naslednje pogoje: označevalec naj bi se tvoril samo v malignem tumorskem tkivu, vsak označevalec naj bi bil značilen za določen organ in tumor, povišane koncentracije TO naj bi bile že zaznavne v začetnih stadijih razvoja tumorske mase in bi odražale velikost tumorja ter označevalec naj bi bil dokazljiv pri vseh bolnikih z istovrstnim malignim tumorjem (19).

1.2.2 CA 19-9

Je karbohidratni krvni antigen, poznan tudi kot sialil-Lewis antigen. Na površini rakavih celic se izraža kot glikolipid ali kot o-vezavni glikoprotein. V normalnih količinah se sintetizira na površini epiteljnega tkiva trebušne slinavke, žolčevodov, želodca, v kolonalnem tkivu, endometriju in žlezem epiteliju. Tukaj služi kot ligand za monocite, makrofage in je tako vpleten v imunski nadzor. Ima tudi funkcijo pri celični adheziji. V serumu je prisoten kot mucinski glikoprotein z molekulsko maso 200-1000 kD. Vsebuje sialični Lewis epitop lakto-*N*-fukopentozo II. Prvotno je bil leta 1979 izoliran iz celične linije SW1116 kolorektalnega karcinoma z uporabo monoklonskih mišjih protiteles 1116-NS-19-9 (16, 19).

Uporablja se predvsem pri spremljanju pankreatičnega in kolorektalnega tumorja, ko je bolezen že histopatološko potrjena. Pri presejalnih testih še vedno predstavlja problem nizka specifičnost, saj je povišan pri več malignih stanjih, kot so: tumorju trebušne slinavke, raku žolčnika, raku želodca, kolorektalnem raku, raku požiralnika in hepatocelularnem raku. Povišan je lahko tudi pri nemalighnih obolenjih, kot so: pankreatitis, ciroza jeter, bolezni žolčevodov oziroma obstrukcija žolčevodov (16, 19).

Pri osebah z Lewis AB-genotipom se CA 19-9 ne izraža. Monoklonska protitelesa se vežejo na mucinske antigenske determinante CA 19-9 in navzkrižno reagirajo z različnimi mucinskimi molekulami samo pri osebah, ki imajo aktiven Lewis gen (19).

1.2.3. CEA

Odkrila sta ga Gold in Freedman leta 1965 pri raku debelega črevesa. Je onkofetalni gliko protein oz. antigen z molekularno maso 180 kD. So glikozil-fosfatidil-inozitol-gliko proteini, ki so na površini celic. Ogljikohidratni del je največkrat sestavljen iz manoze, galaktoze, *N*-acetilglukozamina, fukoze in sialične kisline. Sestavljen je iz enojne polipeptidne verige s 641 aminokislinami, ki imajo na N-terminalnem delu lizin. Gen, ki kodira CEA, spada v družino imunoglobulinov in se nahaja na kromosomu 19p. Normalno nastaja med embrionalnim razvojem v epitelijskih celicah gastrointestinalnega trakta, jeter in trebušne slinavke. Pri odraslem pa se njihova tvorba močno zniža ali ustavi. V normalnih tkivih je pri odraslem prisoten v nižjih koncentracijah v črevesni sluznici in plevri. Pri malignem procesu njegova koncentracija naraste zaradi aktivacije genov, ki kontrolirajo rast celic. CEA je iz iste družine imunoglobulinov kot adhezivni proteini (ICAM1, ICAM2) in ima podobno strukturo, zato predvidevajo, da naj bi bile tudi molekule CEA vpletene v adhezijo celic. CEA naj bi imel vlogo tudi pri zaviranju apoptoze celice (19, 21).

Povišane koncentracije so pogoste pri raku debelega črevesa, danke, trebušne slinavke, pljuč, raku na dojkah, raku želodca in ščitnice, raku jeter, mehurja, jajčnikov in endometrija. Povišan CEA lahko zasledimo tudi pri nemalignih obolenjih, kot so: bronhitis, gastritis, duodenalni ulkus, jetrne okvare, vnetje trebušne slinavke, polipi debelega črevesa in danke. Povišan je lahko tudi pri nebolezenskih stanjih pri kadilcih. V diagnostiki se najpogosteje uporablja pri spremljanju zdravljenja kolorektalnega raka (19).

2. NAMEN DELA

Rak trebušne slinavke je eden od rakov, kjer se srečujemo s problemom poznega odkrivanja in posledično z visoko smrtnostjo. CEA in CA 19-9 sta pogosto uporabljena tumorska označevalca pri obravnavi bolnikov z rakom na trebušni slinavki.

Namen diplomske naloge je proučiti, kakšna je diagnostična vrednost določitve dveh tumorskih označevalcev, karcinoembrionalnega antigena (CEA) in karbohidratnega antigena 19-9 (CA 19-9) pri bolnikih z rakom trebušne slinavke.

Izračunali bomo specifičnost in občutljivost vsakega označevalca posebej in obeh skupaj pri bolnikih z rakom na trebušni slinavki. Ugotoviti bomo poskušali, če se njihova klinična uporabnost in zanesljivost izboljša oziroma spremeni pri kombinirani uporabi CEA in CA 19-9. Rezultate bomo primerjali s kontrolno skupino.

Pri izračunu specifičnosti in občutljivosti bomo upoštevali referenčne vrednosti pri CEA do 4,2 ng/mL in pri CA 19-9 do 37 U/mL.

Skušali bomo ugotoviti, če na koncentracijo CEA in CA 19-9 vpliva lokacija tumorja trebušne slinavke.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. REAGENTI, KALIBRATORJI, KONTROLA

- Spiralna tekočina (fosfatni pufer)
- Predsprožilna raztopina (1,32 % hidrogen peroksid)
- Spožilna raztopina (raztopina 0,35 M NaOH)
- Redestilirana voda
- Natrijev-hipoklorit 0,5 %
- Kit reagentov CA 19-9 (ref. 2K91-20), na aparatu je stabilen do 30 dni.
- Kit reagentov CEA (ref. 7K68), na aparatu je stabilen do 30 dni.
- Kalibrator CA19-9 (ref. 2K91-01)
- Kalibrator CEA (ref. 7K68-02)
- Kontrolni material Multichem/A plus (ref. 05P7610)

Razen Natrijevega-hipoklorita in vode so vsi reagenti iz kompletov reagentov Architect proizvajalca Abbott. Kontrolni material je proizvajalca Technopath.

Spiralni reagent, predsprožilna raztopina in 0,5 % natrijev-hipoklorit so shranjeni na sobni temperaturi. Kiti reagentov za CEA in CA 19-9, kalibratorji in kontrolni material se shranjujejo v hladilniku pri 2–8 °C.

Kit reagentov vsebuje 2 ali več reagenčnih stekleničk, že pripravljenih za uporabo. Opremljen je z dvodimenzionalno kodo, ki vsebuje naslednje podatke: ime preiskave določanja, reagenčno serijsko številko, številko leta, število testov, ki jih lahko naredimo z reagentom, datum poteka veljavnosti reagenta in čas stabilnosti na aparatu.



Slika 2: Komplet reagentov



Slika 3: Kontrolni material



Slika 4: Kalibratorji

3.2 INSTRUMENTI IN OPREMA

Za kvantitativno serumsko analizo CEA in CA 19-9 smo uporabljali analizator ARCHITECT i1000 proizvajalca ABBOT.

- **Natančnost določanja CA 19-9 in CEA:** študija o ponovljivosti rezultatov CA19-9, ki je bila narejena v okviru mednarodnega komiteja za klinične laboratorijske standarde (NCCLD) po protokolu (EP5-A2) in je ocenila na analizatorju ARCHITECT natančnost določanja z <10 % KV (koeficientom variacije). Ponovljivost CEA so izmerili v okviru CLSI (clinical and laboratory standards institute) po protokolu EP5-T2. Določili so natančnost določanja na analizatorju ARCHITECT z < 8 % KV (koeficientom variacije) (28, 29).
- **Analizna specifičnost CEA in CA 19-9:** narejene so bile kontrolne študije o potencialnih snoveh, ki bi lahko vplivale na rezultat oziroma bi lahko lažno zvišale ali znižale rezultat. Snovi, ki bi lahko motile določanje TO so: HAMA protitelesa ali humana mišja protitelesa, heterofilna protitelesa, visoke koncentracije bilirubina, hemoglobina, totalnih proteinov, trigliceridov, prisotnost kemoterapevtskih učinkovin (28, 29).

Koncentracije motečih snovi, ki vplivajo <10 % na analizo CEA:

- Bilirubin..... 22 mg/dL
- Hemoglobin..... 550 mg/dL
- Totalni proteini..... 1,8–13,2 g/dL
- Trigliceridi.....3300 mg/dL (29)

Koncentracije motečih snovi, ki vplivajo < 10 % na analizo CA 19-9

- Bilirubin..... 22 mg/dL
- Hemoglobin..... 600 mg/dL
- Totalni proteini.....10 g/dL
- Trigliceridi..... 5100 mg/dL (28)

- **Analizna občutljivost:** na analizatorju ARCHITECT je bila pri CA 19-9 določena < 2 U/mL in pri CEA < 0,5 ng/mL (28, 29).

Za pripravo vzorcev smo potrebovali: epruvete z gelom, centrifugo, mešalnik vorteks, standardno laboratorijsko opremo.

3.3 METODA DOLOČANJA

Za zaznavo tumorskih označevalcev v nizkih koncentracijah v serumu je potrebna visokointenzivna tehnologija. Tehnike določanja temeljijo na principu določanja kompleksov antigen protiteles. Najbolj razširjene tehnike so encimsko-immunska, luminometrično-immunska in radioimmunska metoda. Specifičnost metod dokazovanja je odvisna predvsem od kvalitete detekcijskih protiteles in specifičnosti protiteles za tumorski označevalec (19, 20).

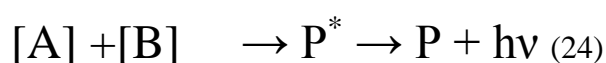
Antigenske determinante CEA in CA 19-9 smo določali po principu avtomatizirane kemiluminiscenčne imunokemijske metode z dvojnimi protitelesi (CMIA).

3.3.1 PRINCIP METODE CMIA

CMIA je nekompetitivna dvostopenjska imunotehnika z mikrodelci. Nekompetitivna dvostopenjska tehnika običajno zagotavlja najvišjo stopnjo občutljivosti in specifičnosti. Tehnika se imenuje tudi »sendvič test«, saj se analit veže med dvoje specifičnih protiteles. Immunska reakcija pri CMIA poteče med paramagnetnimi mikrodelci prevlečenimi s specifičnimi antigenom ali protitelesi in z akridinijem označenim konjugatom ter s specifičnimi protitelesi v vzorcu (23).

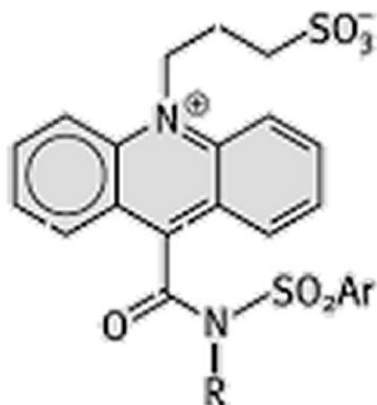
Kvantitativno določanje antigena pri CMIA omogoča z akridinjem označen konjugat, ki povzroči kemiluminiscenco. Pri ARCHITECT analizatorju se za označevanje protiteles uporablja akridinijev sulfonamid. Hidrofilna N-sulfopropilna skupina na akridinijevem obroču poveča vodotopnost in učinkovitost reakcije. Na akridinijevem obroču je tudi sulfonamidna skupina, ki poveča stabilnost spojine (26). Označeno protitelo, ki reagira z analitom, povzroči spremembo signala in ta se izmeri na podlagi kemiluminiscenčne reakcije. Pri nekompetitivnih testih je merjenje označenega protitelesa neposredno sorazmerno s količino določenega antigena prisotnega v vzorcu (23).

Kemiluminiscenčna reakcija:



A, B – reaktanta, P* – produkt v vzbujenem stanju, P – produkt v osnovnem stanju,

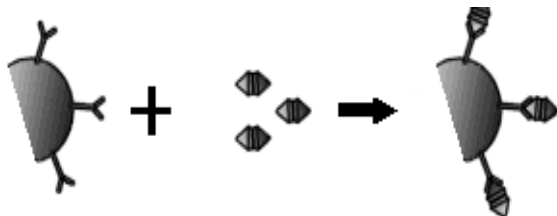
$h\nu$ – emitirana svetloba



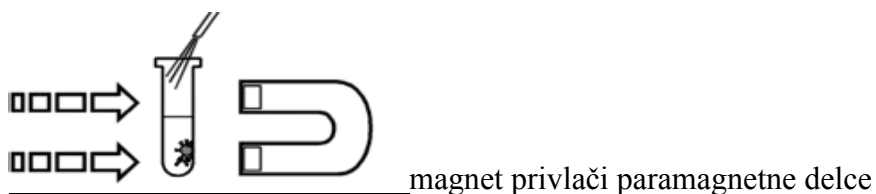
Slika 5: Akridinijev sulfonamid (23)

3.3.1.1 STOPNJE CMIA

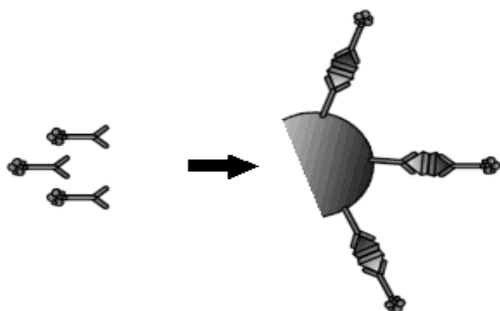
- Inkubacija vzorca s paramagnetnimi mikrodelci in s specifičnimi vezavnimi determinantami, sledi vezava specifičnih protiteles iz vzorca na ustrezne molekule na mikrodelcih. Nastane imunski kompleks.



- Imunski kompleks se s paramagnetnimi delci prilepi na steno reakcijske posodice in nato sledi spiranje nevezanih delcev v reakcijski mešanici.



- Inkubacija z akridinijem označenim konjugatom, ki se veže na imunski kompleks in nato sledi spiranje nevezanih delcev.



- Pri dodatku hidrogen-peroksida v prisotnosti natrijevega-hidroksida pride do oksidacije akridinija. Nastane vmesni produkt, ki je v vzbujenem stanju. Pri prehodu produkta nazaj v osnovno stanje nastane kemiluminiscenčna svetloba.

Legenda grafičnih simbolov:



①

Paramagnetni mikrodenci z vezanimi specifičnimi protitelesi



②

Določani analit



③

Z akridinijem označeno protitelo

3.3.2 AVTOMATIZIRANO DOLOČANJE CEA IN CA 19-9 NA APARATU ARCHITECT

V računalniški sistem aparata smo naročili kontrolo za CEA in CA 19-9, kalibracijo po potrebi in preiskave za CEA in CA 19-9. Pripravljene kontrole in vzorce smo naložili v vzorčno stojalo, ki smo ga vstavili v vhodno transportno pot ter zagnali aparat. Avtomatizirana analiza vzorcev na aparatu ARCHITECT poteče v naslednjih korakih:

- Robotska roka prenese vzorce do aspiracijskega dela, kjer se vzorec aspirira in odpipetira v kiveto v procesni poti.
- V naslednji stopnji sledi dodatek paramagnetnih mikrodencov, prekritih s protitelesi v kiveto. Sledi mešanje, inkubiranje in spiranje nevezanih delcev. Na koncu se še doda konjugat s protitelesi označenimi z akridinijem in nato sledi zopet mešanje, inkubiranje in spiranje nevezanih delcev.
- Reakcijski mešanici v kiveti se doda pedsprožilna raztopina vodikovega peroksida, nato optični sistem izmeri ozadje. Pedsprožilna tekočina naredi kislo okolje in s tem prepreči prehitro emisijo svetlobe ter ohranja mikrodence v skupkih.

- Nazadnje se doda še sprožilna raztopina natrijevega-hidroksida. Optični sistem usmeri nastalo kemiluminiscenčno emisijo do CMIA čitalca s fotopomnoževalko. Iz intenzitete kemiluminiscenčne reakcije se izračuna koncentracija analita.
- Vsebina reakcijske mešanice se aspirira iz kivete v tekoči odpad in prazna kiveta se odstrani v trdi odpad (27).

3.3.2.1 PRETVORBA PODATKOV V KONCENTRACIJO NA APARATU ARCHITECT

Zbirni podatki se pretvorijo v končni rezultat v relativnih svetlobnih enotah (RLU). Pri izračunu se povzame vsota vseh signalov, ki jih izmeri optični sistem. Zagotovljeni morajo biti naslednji pogoji: seštevek ozadja in aktivirani čitalni profil mora biti znotraj sprejemljivih mej. Izmerjeno ozadje se odšteje od aktiviranega odčitka in dobimo končni rezultat v relativnih svetlobnih enotah, ki se pretvorijo v koncentracijo (27).

Izračun:

Končni odčitek (RLU) = aktivirani odčitek – ozadje (background)

Pretvorba podatkov v koncentracijo se izračunajo s pomočjo 4-parametrične logistične krivulje (4PLC). 4PLC metoda uporabi razliko med napovedno in opazovano koncentracijo kalibratorja oziroma signal za nastanek kalibracijske krivulje (27).

3.3.2.2 DOLOČANJE CA 19-9

Pri določanju CA19-9 se za dokazovanje 1116-NS-19-9 reaktivnih determinant uporabljajo mišja 1116-NS-19-9 protitelesa. Reagent za določevanje vsebuje mikrodelce z vezanimi protitelesi 1116-NS-19-9 v citratnem pufru in konjugat. Konjugat vsebuje z akridinijem označena 1116-NS-19-9 protitelesa v fosfatnem pufru z govejim proteinskim stabilizatorjem (28).

Linearnost metode določanja je do koncentracije 1200 U/mL. Vzorci s koncentracijo > 1200 U/mL se avtomatsko redčijo z že upoštevanim faktorjem redčenja (31).

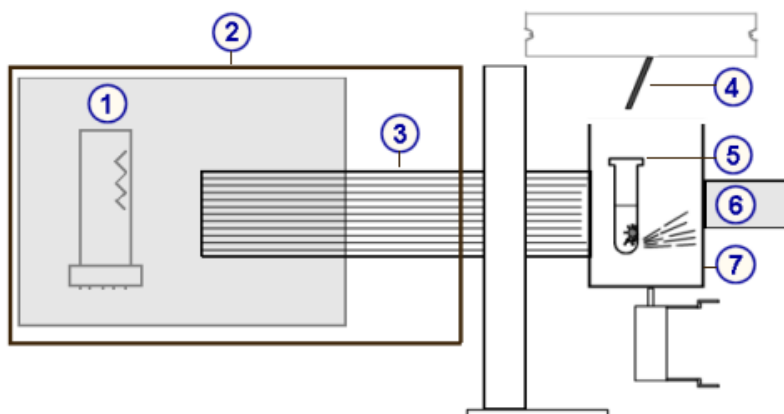
3.3.2.3 DOLOČANJE CEA

Pri določanju CEA antigenskih determinant se uporabljajo mišja protitelesa. Reagent je sestavljen iz mikrodelcev prevlečenih z anti-CEA mišjimi monoklonskimi protitelesi v Tris pufru s proteinskim govejim stabilizatorjem. Drugi del reagenta je iz konjugata, ki vsebuje

anti-CEA monoklonska mišja protitelesa označena z akridinijem v fosfatnem pufru s proteinskim govejim stabilizatorjem (29).

Linearnost metode določanja je do koncentracije 1500 ng/mL. Vzorci s koncentracijo

> 1500 ng/mL se redčijo avtomatsko z že upoštevanim faktorjem redčenja (30).



Slika 6: Optični sistem aparata ARCHITECT (27)

Legenda:

- | | |
|-------------------------------|------------------------|
| 1. Fotopomnoževalna cev | 5. Reakcijska posodica |
| 2. CMIA čitalec | 6. Magnet |
| 3. Svetlobna cev | 7. Zbiralnik CMIA |
| 4. Šoba za sprožilno tekočino | |

3.3.2.4 KALIBRACIJA CEA in CA 19-9

Kalibracijo smo izvajali po zamenjavi serije reagentov in pri odstopanju rezultatov kontrol izven kontrolnega območja. Pri CEA smo za umerjanje aparata uporabili kalibrator 1 in 2, ki se merita v dvojniku. Za kalibracijo CA 19-9 smo testirali kalibrator A, B, C, D, E in F z dvakratno meritvijo. Vsak paket reagentov vsebuje kartico z umeritveno krivuljo sistema (Master calibration curve), ki vsebuje podatke o koncentraciji analita in RLU za vsako kalibracijsko točko za to serijo reagenta. Kalibracijo smo ocenili tako, da smo kontrolni vzorec testirali na vseh treh kontrolnih nivojih (nizek, srednji, visok). Kalibracijo smo potrdili oziroma sprejeli, če so bile izmerjene vrednosti kontrol znotraj kontrolnega območja.

3.4 ZBIRANJE IN PRIPRAVA VZORCEV

Imeli smo dve vzorčni skupini. Vzorčna skupina A je sestavljala 92 bolnikov s postavljenjo diagnozo rak trebušne slinavke. Bolniki so se zdravili v obdobju od januarja 2014 do decembra 2014 v UKC Ljubljana na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo. Skupina B je bila kontrolna skupina, ki je obsegala 91 oseb, ki niso imele malignih ali drugih aktivnih bolezni.

Venozna kri je bila odvzeta v epruvete z gelom. Po odvzemu so bile epruvete na sobni temperaturi v stojalu približno 20 minut, da je kri koagulirala. Nato smo kri centrifugirali 10 minut na 3200 obratih. Po centrifugiranju je bil odpipetiran serum v prazne epruvete. Odliti serumi so bili zamrznjeni pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize. Na dan analize smo odmrznili serume, jih premešali na vorteks mešalniku in jih ponovno centrifugirali.

Stabilnost vzorcev:

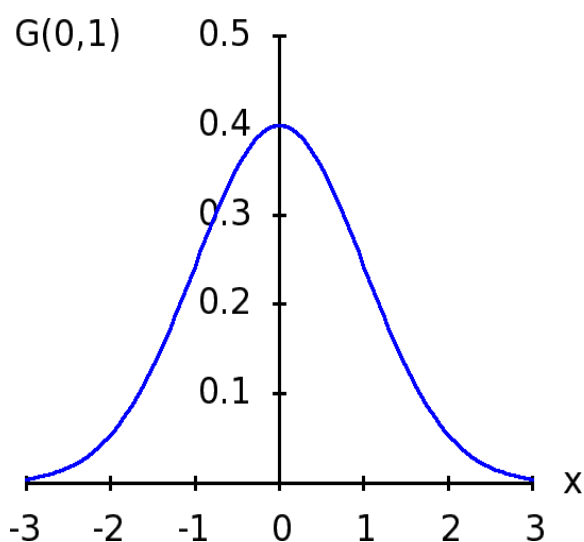
CA 19-9 je v primarni krvi stabilen 7 dni pri sobni temperaturi. V serumu je stabilen 1 mesec pri $4\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 mesece pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 7 dni pri sobni temperaturi (28).

CEA je v primarni krvi stabilen 3 dni pri sobni temperaturi. V serumu je stabilen 6 mesecev pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pri $4\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 7 dni in pri $20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 7 dni (29).

3.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

3.5.1 TESTIRANJE NORMALNOSTI PORAZDELITVE

Normalna porazdelitev je verjetnostna porazdelitev vrednosti statističnih enot v statistični populaciji. Krivulja normalne porazdelitve je v obliki zvona. Imenujemo jo Gaussova krivulja oziroma Gaussova porazdelitev. Pri obdelavi podatkov je testiranje porazdelitve zelo pomembno, saj je večina testov razdeljenih na osnovi tega, kako se podatki porazdeljujejo. Pri uporabi testa, ki ne ustreza pravilni porazdelitvi podatkov bodo rezultati neveljavni in zavajajoči (32).



Graf 1: Gaussova porazdelitev (58)

Ker smo imeli vzorec večji od 50 podatkov, smo porazdelitev podatkov ugotavljali s Kolmogorov-Smirnovim testom in izrisom histograma. Izris histograma nam je v veliko pomoč, saj že na pogled lahko vidimo, če odstopa od normalne porazdelitve in v tem primeru nadaljnja testiranja niso potrebna. Kolmogorov-Smirnov test je neparametričen test, ki ugotavlja povezavo med normalno porazdeljenimi podatki in našimi podatki. Glede na dobljeno vrednost p , ki jo primerjamo s stopnjo tveganja ($\alpha = 5\%$) zavrnilo ali potrdimo ničelno hipotezo (35).

Hipoteze:

H_0 : Med podatki v normalni populaciji in našimi podatki ni razlike ($p > \alpha$).

H_1 : Porazdelitev podatkov v populaciji z normalno porazdelitvijo podatkov in naši populaciji je različna ($p < \alpha$).

3.5.2 TESTIRANJE MOČI POVEZAVE MED CEA IN CA 19-9

Moč povezave oziroma korelacijski koeficient (r) med spremenljivkama CA19-9 in CEA smo ugotavljali s statistično neparametričnim testom, Spearmanovim koeficientom korelacije. Koeficient r nam ne pove vzročno-posledične odvisnosti med spremenljivkama ampak stopnjo povezave (jakost moč) in smer povezave. Ugotavljali smo ali se spremenljivki gibljeta v isto ali nasprotno smer. Izračunane vrednosti r se gibljejo od -1 in +1. Spearmanov koeficient korelacije ne predpostavlja linearne povezanosti spremenljivk in enakomernosti frekvenčne porazdelitve. Podatki so preoblikovani v range. Za končni

izračun se uporabi razlika med rangi različnih vednosti, pri katerih se ugotavlja medsebojna odvisnost (34, 35).

Izračun:

$$\rho = 1 - 6 \frac{\sum d^2}{N(N^2-1)} \quad \text{enačba 1 (35)}$$

ρkorelacijski koeficient

d razlika med rangoma spremenljivk

Nštevilo meritev

Hipoteze:

H_0 : Med spremenljivkama ni povezave ($p > \alpha$).

H_1 : Med spremenljivkama je povezava ($p < \alpha$).

3.5.3 PRIMERJAVA KONCENTRACIJ CEA in CA 19-9 MED VZORČNIMA SKUPINAMA

Preverjanje domneve o enakosti srednje vrednosti tumorskih označevalcev v 2 neodvisnih vzorcih smo ugotavljali z neparametričnim Mann-Whitneyvim testom (U) in Wilcoxonovim testom vsote rangov (W_s). Testa sta primerna za dva neodvisna vzorca, kjer so podatki nenormalno porazdeljeni. Test temelji na tem, da se povprečna ranga enega ali drugega vzorca razlikujeta samo v mejah slučajnosti. Podatki obeh vzorcev se uredijo v eno ranžirno vrsto in se rangirajo. Test testira, če sta povprečna ranga enaka oziroma ali je verjetnost, da ima enota iz skupine A večjo vrednost kot enota iz druge skupine B, enaka 0,5 (35, 36).

3.5.3.1 MANN-WHITNEYEV U-TEST

Mann-Whitneyev U-test temelji na testni statistiki U. Pri izpeljavi tega testa mora imeti vsaka meritev definirani dve spremenljivki, neodvisno oziroma kategorično in odvisno oziroma kvantitativno spremenljivko. Kategorična spremenljivka razdeli podatke v dve skupini oziroma v dva ranga, ne glede na skupino h kateri pripadajo meritve (36).

Hipoteze:

H_0 : $P(A > B) = 0,5$; verjetnost da meritev iz skupine A preseže meritev iz skupine B je enaka polovici.

H_1 : $P(A > B) \neq 0,5$; verjetnost, da meritev iz skupine A preseže meritev iz skupine B, ni enaka polovici.

Če je $p > 0,05$ potrdimo ničelno hipotezo, kar pomeni, da med skupino A in skupino B ni statistično značilne razlike. Pri $p < 0,05$ velja alternativna hipoteza, kar pomeni, da je med skupinama A in B statistično značilna razlika.

Izračun Mann-Whitneyevega U-testa:

$$U = n_1 \cdot n_1 + \frac{n_2 \cdot (n_2 + 1)}{2} - \sum_{i=n_2+1}^{n_2} R_i \quad \text{enačba 2 (36)}$$

U.....Mann-Whitneyev U-test,

n_1 velikost vzorca 1

n_2velikost vzorca 2

R_irang velikosti vzorca

3.5.3.2 WILCOXONOV TEST VSOTE RANGOV (WS)

Vrednost W_s statistike je statistično značilna pri $p < 0,05$, če je njena absolutna standardizirana vrednost Z večja od 1,96 (35).

Izračun vrednosti Z:

$$Z = \frac{W_s - W_s^*}{SE_{WS}} \quad \text{enačba 3 (35)}$$

W_sWilcoxonov test vsote rangov

W_s^*povprečna vrednost testne statistike

SE_{WS}standardna napaka

$$W_{S^*} = \frac{n_1(n_1+n_2+1)}{2} \text{ enačba 4 (35)}$$

n_1, n_2, \dots Število meritev v prvem in drugem vzorcu

3.5.4 PRIMERJAVA KONCENTRACIJ CEA in CA 19-9 GLEDE NA LOKACIJO TUMORJA

Statistično značilno razliko povprečnih vrednosti v koncentraciji TO glede na lokacijo tumorja v trebušni slinavki smo ugotavljali z neparametričnim Kruskal-Walisovim testom. S testom smo ugotavljali razlike srednjih vednosti oziroma smo testirali enakost srednjih vrednosti pri treh ali več vzorcih. Test testira, če so povprečni rangi enaki po skupinah. Izračunali smo range na podlagi odvisne spremenljivke za vse skupine skupaj. Primerjali smo variabilnost rangov znotraj skupin v primerjavi s tisto med skupinami. Stopnja tveganja se izračuna na podlagi H-statistike. Pri H-statistiki imamo χ^2 porazdelitev s $k-1$ stopinjami prostosti, kjer je k število skupin (34).

Izračun H-statistike:

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \sum \frac{R_j^2}{n_j} - 3 \cdot (n + 1) \text{ enačba 5 (34)}$$

H..... Kruskal-Wallisov test

n_j, \dots število podatkov vseh vzorcev,

R..... rang

Hipoteze:

H_0 : Koncentracije TO se glede na lokacijo tumorja ne razlikujejo ($p > 0,05$).

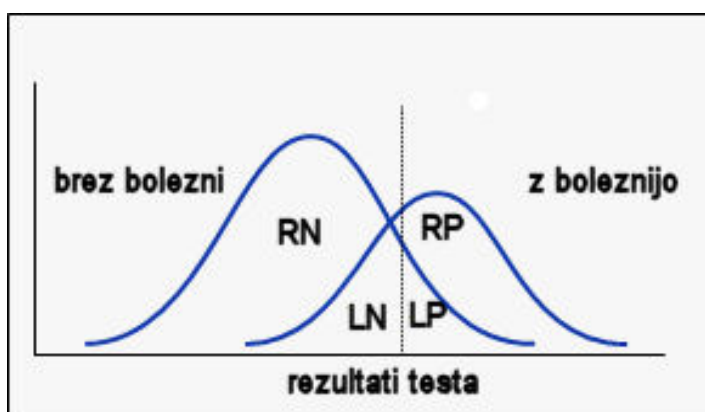
H_1 : Koncentracije TO se razlikujejo glede na lokacijo tumorja ($p < 0,05$).

3.5.5 IZRAČUN SPECIFIČNOSTI IN OBČUTLJIVOSTI CEA IN

CA 19-9

Z izračunom specifičnosti in občutljivosti smo opredelili oziroma ocenili TO, kako dobro loči med obolelimi in zdravimi.

Specifičnost in občutljivost smo izračunali s pomočjo priprave kontingenčne tabele. Naše meritve smo s pomočjo definiranih referenčnih vrednosti opredelili v resnično/lažno pozitivne vrednosti in resnično/lažno negativne vrednosti.



Slika 7: Občutljivost, specifičnost testa

Preglednica II: Kontingenčna tabela

TO	BOLEZEN	
	PRISOTNA	NI PRISOTNA
POZITIVEN TO ⁺	RP	LP
NEGATIVEN TO ⁻	LN	RN

$$\text{Občutljivost (\%)} = \frac{RP}{RP+LN} \text{ enačba 6 (34)}$$

$$\text{Specifičnost (\%)} = \frac{RN}{RN+LP} \text{ enačba 7 (34)}$$

Občutljivost se izračuna samo pri ljudeh, ki imajo bolezen, saj je pri ocenjevanju občutljivosti pomemben delež bolnih ljudi s pozitivnim izidom TO. Občutljivost nam torej ne pove ničesar o deležu zdravih ljudi s pozitivnim izidom TO. Pri občutljivosti tumorskega označevalca se pokaže, kolikšen je delež bolnikov z določenim tumorjem in kolikšno je število lažno negativnih (LN) določitev. Manjše je število LN-rezultatov in čim večji je delež določitev bolnikov z istovrstnim tumorjem, bolj občutljiv je označevalec. TO z visoko občutljivostjo bo z večjo verjetnostjo pravilno izločil bolezen, če bo ta negativen (34).

Pri zdravih ljudeh izračunamo specifičnost, kjer dobimo delež zdravih ljudi z negativnim izidom TO, medtem ko ne vemo nič o bolnih ljudeh z negativnim izidom bolezní. Specifičnost nam pove, kolikšen je delež preiskovancev, ki nimajo določene maligne bolezni in imajo normalen nivo označevalca. Specifičnost je torej večja, če je označevalec čim manjkrat povišan pri ljudeh brez določene vrste tumorja oziroma je rezultat lažno pozitivnih določitev čim nižji. TO z visoko specifičnostjo bo bolj uporaben pri potrditvi bolezni pri osebah s povišanim TO (17, 34).

3.5.6 IZRAČUN PNV, NNV CEA IN CA 19-9

Verjetnost o prisotnosti bolezni ob pozitivnem ali negativnem izidu TO smo ugotavljali z izračunom PNV in NNV.

PNV nam pove, kolikšen je delež oseb s povišanim TO, ki imajo bolezen. NNP nam pove, kolikšen je delež oseb z negativnim TO in nimajo bolezni. PNV in NNP se spreminjata s specifičnostjo in občutljivostjo. NNV narašča z občutljivostjo in PNV narašča s specifičnostjo. PNV in NNP sta odvisni od pogostosti bolezni in se z njo tudi spreminjata, kar moramo upoštevati pri izračunu. PNV z višanjem pogostosti narašča in NNV z višanjem pogostosti pada (34, 40).

Pogostost ali prevalenca bolezni pomeni število ljudi z določeno boleznijo v določeni populaciji, ki so bili živi na zadnji dan v letu ne glede na to kdaj so zboleli. V registru raka RS Slora je do 31. 12. 2012 zabeleženih 314 živih oseb z diagnozo rak trebušne slinavke (37).

$$PNV = \frac{RP}{(RP+LP)} \cdot \text{pogostost} \quad \text{enačba 8 (34)}$$

$$NNV = \frac{RN}{(RN+LN)} \cdot \text{pogostost} \quad \text{enačba 9 (34)}$$

Specifičnosti in občutljivosti ne moremo uporabiti pri oceni verjetnosti za bolezen, lahko ju kombiniramo in dobimo razmerje verjetja ali LR. Razmerje verjetja povezuje pogostost bolezni pri oceni verjetnosti za bolezen pri obolelem. Imamo razmerje verjetja za pozitiven test (LR+) in razmerje verjetja za negativen test (LR-) (39).

$$LR+ = \frac{\text{občutljivost}}{1-\text{specifičnost}} \quad \text{enačba 10: pogojna verjetnost za pozitiven test (39)}$$

$$LR- = \frac{1-\text{občutljivost}}{\text{specifičnost}} \quad \text{enačba 11: pogojna verjetnost za negativen test (39)}$$

Vrednotenje rezultatov LR: pri $LR > 1$ se verjetnost za bolezen poveča in pri $LR < 1$ se verjetnost za bolezen zniža (39).

3.5.7 ROC KRIVULJA

Specifičnost in občutljivost smo grafično prikazali s pomočjo ROC krivulje. ROC analiza nam omogoča oceno zanesljivosti tumorskega označevalca. Pokaže nam razmerje med občutljivostjo na y-osi in (1-specifičnost) na x-osi. Iz ROC krivulje lahko vidimo, kako se občutljivost spreminja s specifičnostjo pri različnih »cut off« vrednostih. Glede na to lahko določimo optimalno »cut off« vrednost, pri kateri bo imel TO pravo kombinacijo specifičnosti in občutljivosti in bo najbolje ločil bolne in zdrave. Prednost ROC krivulje je, da je neodvisna od pogostosti bolezni, saj temelji na specifičnosti in občutljivosti, ki nista odvisni od pogostosti bolezni. Pri ROC krivulji lahko primerjamo in ocenimo dva TO hkrati (38, 40).

3.5.7.1 AUC

Površina pod krivuljo AUC nam pove, kako dobro TO loči med bolnimi in zdravimi. Večja, kot je površina pod krivuljo, boljša je klinična uporabnost TO. Maksimalen AUC = 1, kar pomeni, da ima TO 100-odstotno občutljivost in specifičnost in nimamo nič LP in LN rezultatov, kar pa je seveda v praksi skoraj nemogoče (38, 40).

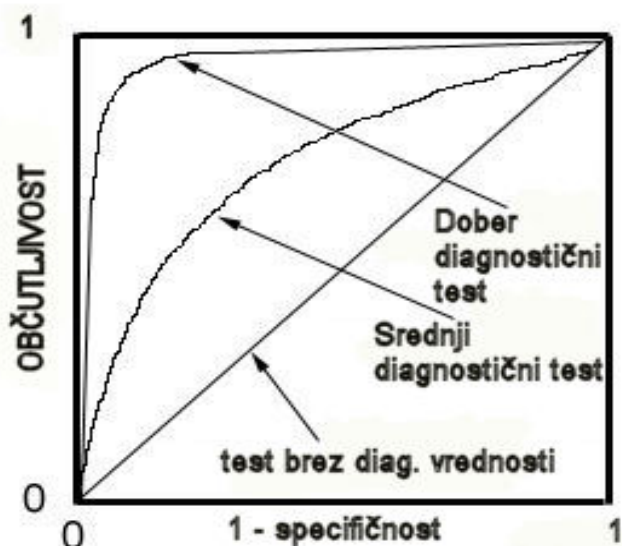
(AUC) lahko interpretiramo kot verjetnost, da bo TO pripisal višji rang naključno izbranemu bolniku z rakom kot naključno izbrani osebi. Ta interpretacija temelji na neparametrični statistiki Mann-Whitneyvega U-testa, ki se uporablja pri izračunu AUC. Uporabljajo se tudi razlage povprečne vrednosti občutljivosti za vse možne vrednosti specifičnosti in obratno (38, 40).

Izračun AUC:

$$AUC = \frac{U}{n_1 \cdot n_2} \quad \text{enačba 12 (41)}$$

U.....vrednost Mann-Whitneyeve U-statistike

n1 in n2..... števili meritev enega in drugega vzorca



Graf 2: ROC krivulja (41)

4. REZULTATI

V serumu smo izmerili koncentracije CEA in CA 19-9 pri dveh skupinah ljudi. Skupina (A) je imela potrjeno diagnozo rak na trebušni slinavki. Skupina (B) je bila kontrolna skupina ljudi brez malignih ali drugih aktivnih bolezenskih procesov. V skupini A je bilo 92 oseb in v skupini B 91 oseb. V skupini A je bilo 52 moških in 40 žensk s povprečno starostjo 72,6 let. V skupini B je bilo 38 moških in 53 žensk s povprečno starostjo 71 let.

Pri zbiranju in obdelavi rezultatov oz. podatkov smo uporabljali računalniški program Excel in statistični program SPSS.

Preglednica III: Statistični parametri skupine A in B pri CEA

	SKUPINA A (ng/mL)	SKUPINA B (ng/mL)
SREDNJA VREDNOST	55,37	2,7
ŠTEVILO VZORCEV	92	91
OBMOČJE, MEDIANA	(19,6–91)7,1	(1,72–3,85)1,8
STAND. DEVIACIJA	172,3	5,1
MIN., MAKS.	0,8; 1110,1	0,6; 48,2

Preglednica IV: Statistični parametri skupine A in B pri CA 19-9

	SKUPINA A (U/mL)	SKUPINA B (U/mL)
SREDNJA VREDNOST	16867,3	9,6
ŠTEVILO VZORCEV	92	91
OBMOČJE, MEDIANA	(9533–2420) 719	(7,76–11,4) 5,8
STAND. DEVIACIJA	719,5	8,9
MIN., MAKS.	2,0; 120000	2,0; 46,5

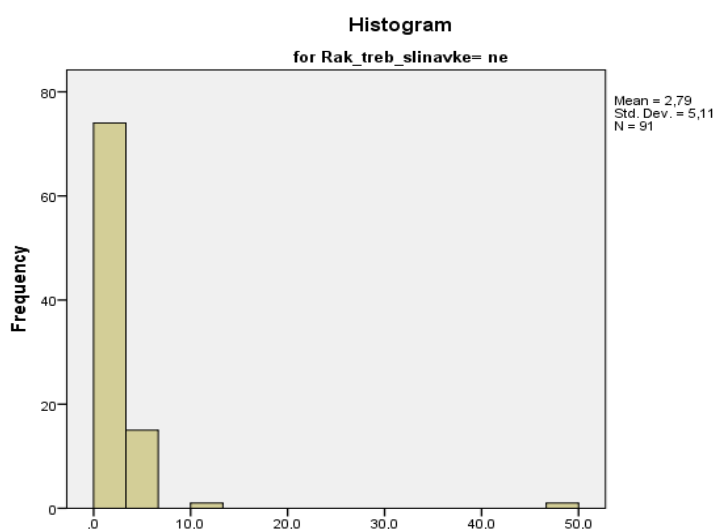
Iz podatkov v preglednicah III in IV lahko razberemo, da je standardna deviacija pri obeh TO večja pri skupini obolelih z rakom, kot pri kontrolni skupini. Variacija in razpršenost podatkov je torej v skupini A pri obeh TO večja. Če primerjamo mediani TO obeh skupin, iz preglednic III in IV razberemo, da je tudi ta pri skupini A precej višja pri obeh TO. Iz teh podatkov lahko sklepamo, da so koncentracije obeh TO višje v skupini A, kar lahko razberemo tudi iz 95-odstotnega intervala zaupanja, ki ima zgornjo mejo pri višjih koncentracijah v skupini A kot pa pri kontrolni skupini B, pri obeh TO. Statistični parametri nam torej nakazujejo višje koncentracije obeh TO pri skupini obolelih z rakom trebušne slinavke.

4.1 PORAZDELITEV PODATKOV

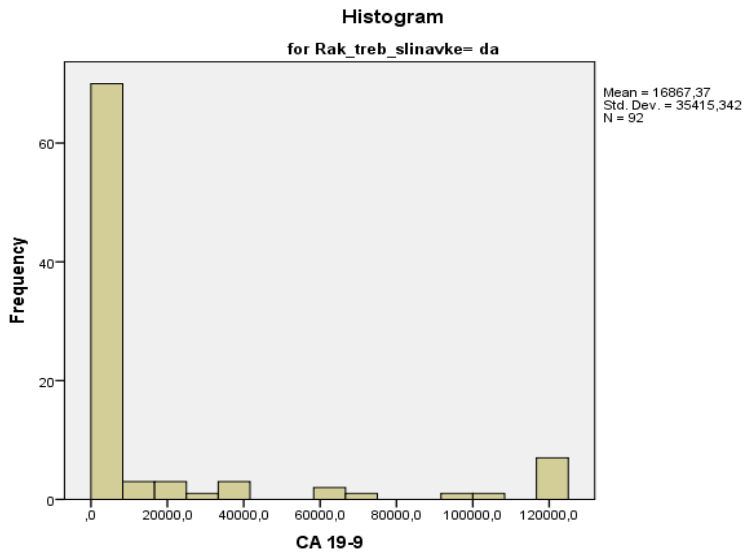
Pri testiranju podatkov s Kolmogoro- smirnovim smo dobili vrednost $p < 0,05$ (preglednica V), kar nam kaže na nenormalno porazdelitev podatkov. Tudi pri prikazu histogramov (grafi: 3, 4, 5, 6), lahko vidimo, da se porazdelitev podatkov razlikuje od normalne porazdelitve, saj ne dobimo tipične Gaussove krivulje, ki je značilna za normalno porazdelitev.

Preglednica V: Kolmogorov- Smirnov test vzorca A in B

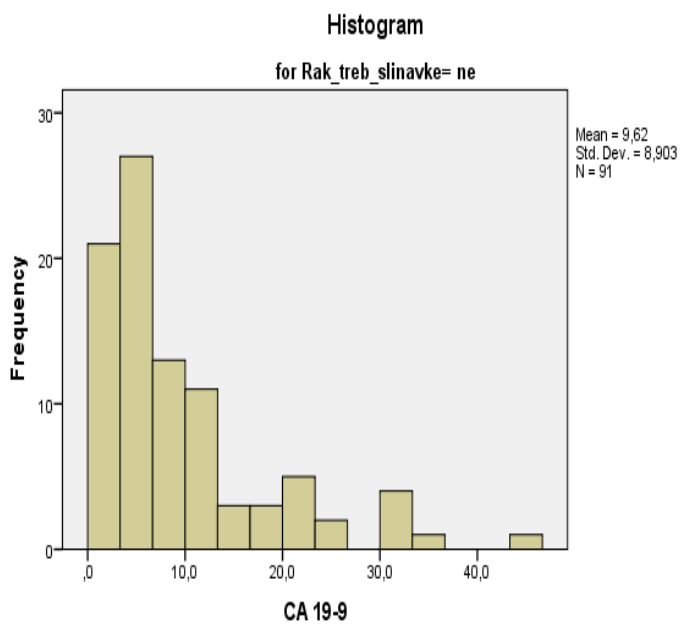
		Kolmogorov-Smirnov test		
		statistika	df	p
CEA	Skupina A	0,379	92	0.000
	Skupina B	0,334	91	0.000
CA 19-9	Skupina A	0,369	92	0.000
	Skupina B	0,196	91	0.000



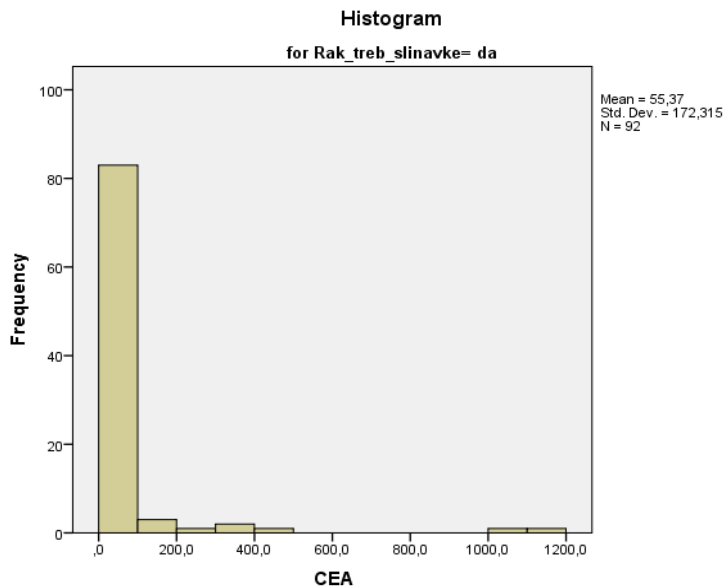
Graf 3: Porazdelitev podatkov CEA skupine B



Graf 4: Porazdelitev podatkov CA 19-9 skupine A



Graf 5: Porazdelitev podatkov CA 19-9 skupine B



Graf 6: Porazdelitev podatkov CEA v skupini A

4.2 KORELACIJA MED CEA IN CA 19-9

Moč povezave med CEA in CA 19-9 smo določili z izračunom Spearmanovega koeficienta korelacije. Vrednost p je pri obeh označevalcih manjša od stopnje tveganja $\alpha < 0,05$ (preglednica VI), kar nam pokaže statistično značilno povezavo med CEA in CA 19-9. Vrednost koeficienta korelacije je pozitivna, kar pomeni, če se zvišuje eden TO, se bo višal tudi drugi. Iz korelacijskega koeficienta 1 (preglednica VI), lahko vidimo močno povezanost med CEA in CA 19-9.

Preglednica VI: Spearmanov koeficient korelacije

	Korelacijski koef.	p	Št. vzorcev
CEA	1	0,001	92
CA 19-9	1	0,001	92

4.3 PRIMERJAVA SREDNJIH VREDNOSTI MED SKUPINAMA A IN B

Pri preverjanju statistično značilne razlike srednjih vrednosti med skupinama z Mann-Whitney testom in Wilcoxonovim W-testom (preglednica VIII), dobimo pri obeh TO vrednost testne statistike statistično značilno različno od 0 pri tveganju manjšem od 0,05. Pri tveganju 0,05 lahko trdimo, da srednji vrednosti med skupinama A in B nista enaki.

Preglednica VII: Rangiranje podatkov

		N	SREDNJI RANG	VSOTA RANGOV
CEA	Skupina A	92	123,29	11343,00
	Skupina B	91	60,36	5493,00
CA 19-9	Skupina A	92	123,93	11401,50
	Skupina B	91	59,72	5434,50

Preglednica VIII: Mann-Whitneyev U in Wilcoxonov W-test

	CEA	CA 19-9
Mann-Whitneyev U	1307	1248,5
Wilcoxon W	5493,0	5434,5
Z	-8,037	-8,199
p	0,000	0,000

4.4 RAZLIKE KONCENTRACIJ CEA IN CA 19-9 GLEDE NA LOKACIJO TUMORJA

Meritve CEA in CA 19-9 pri skupini A smo razdelili na več skupin glede na lokacijo tumorja. Imeli smo skupine z naslednjimi lokacijami tumorjev trebušne slinavke: glava, rep, telo, endokrini del trebušne slinavke, preraščajoča lezija trebušne slinavke in neopredeljeni del trebušne slinavke. S Kruskal-Wallisovim testom (preglednica IX), nismo ugotovili statistično značilne razlike ($p > 0,05$) v koncentraciji TO med temi skupinami. Tveganje pri zavrnitvi ničelne hipoteze bi bilo pri CEA 9,4 % in pri CA 19-9 96,3 %. Tveganje je preveliko, zato ne moremo trditi, da se srednji vrednosti CEA in CA 19-9 med skupinami razlikujejo.

Preglednica IX: Kruskal-Wallisov test

	CEA	CA 19-9
Hi-kvadrat	10,826	1,450
df	6	6
Vrednost p	0,094	0,963

Preglednica X: Rangiranje podatkov pri Kruskal-Wallis testu

	LOKACIJA RAKA	N	Vsota ranga
CEA	GLAVA TREBUŠNE SLINAVKE	44	53,31
	TELO TREBUŠNE SLINAVKE	12	36,71
	REP TREBUŠNE SLINAVKE	9	53,67
	ENDOKRINI DEL TREBUŠNE SLINAVKE	2	21,00
	DRUGI DELI TREBUŠNE SLINAVKE	2	19,00
	PRERAŠČAJOČA LEZIJA TREBUŠNE SLINAVKE	14	43,71
	TREBUŠNA SLINAVKA NEOPREDELJENO	9	35,22
CA 19-9	GLAVA TREBUŠNE SLINAVKE	44	48,02
	TELO TREBUŠNE SLINAVKE	12	41,00
	REP TREBUŠNE SLINAVKE	9	42,28
	ENDOKRINI DEL TREBUŠNE SLINAVKE	2	39,50
	DRUGI DELI TREBUŠNE SLINAVKE	2	39,50
	PRERAŠČAJOČA LEZIJA TREBUŠNE SLINAVKE	14	50,21
	TREBUŠNA SLINAVKA NEOPREDELJENO	9	47,94

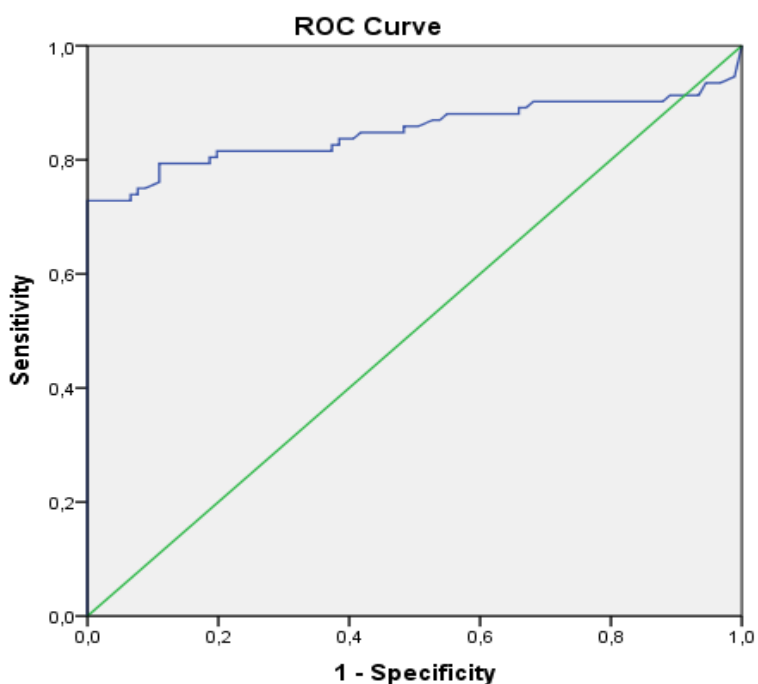
4.5 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST CA 19-9

Preglednica XI: Kontingenčna tabela CA 19-9

TO	BOLEZEN	
	PRISOTNA BOLEZEN	NI BOLEZNI
POZITIVEN TO ⁺	RP (67)	LP (1)
NEGATIVEN TO ⁻	LN (25)	RN (90)

Občutljivost = 72,8 %; **specifičnost** = 98,9 %; **PNV** = 3 %; **NNV** = 2,45 %

LR+ = 66,1; **LR-** = 0,27



Diagonal segments are produced by ties.

Graf 7: ROC krivulja CA 19-9

Preglednica XII: Površina ROC krivulje CA 19-9

AUC	0,851
STAND. NAPAKA	0,033
VREDNOST p	0,000
INTERVAL ZAUPANJA (95 %)	0,787-0,915

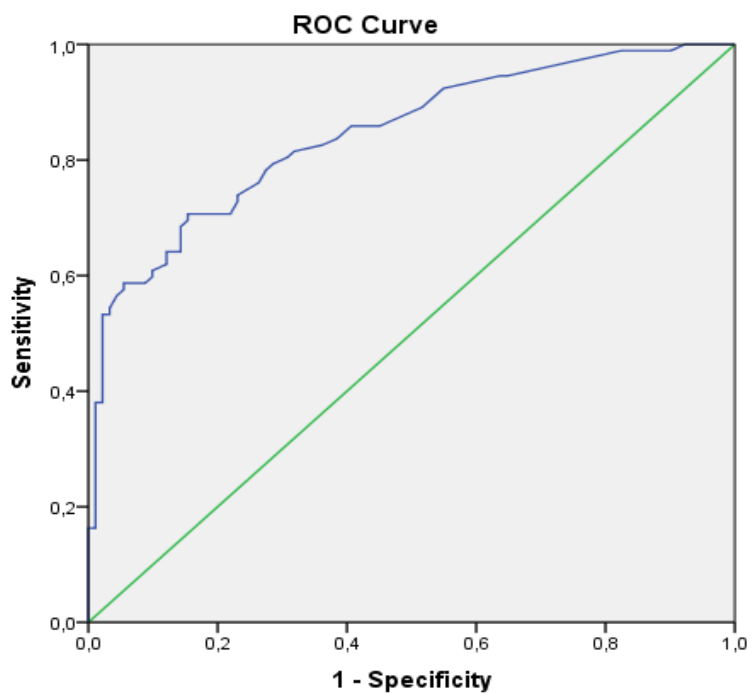
4.6 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST CEA

Preglednica XIII: Kontingenčna tabela CEA

TO	BOLEZEN	
	PRISOTNA BOLEZEN	NI BOLEZNI
POZITIVEN TO ⁺	RP (59)	LP (12)
NEGATIVEN TO ⁻	LN (33)	RN (79)

Občutljivost = 64 % **specifičnost** = 86,8 %

PNV = 2,6 %; **NNV** = 2,2 %; **LR+** = 4,8; **LR-** = 0,41



Diagonal segments are produced by ties.

Graf 8: ROC krivulja CEA

Preglednica XIV: Površina ROC krivulje CEA

AUC	0,844
STAND. NAPAKA	0,029
VREDNOST p	0,000
INTERVAL ZAUPANJA (95 %)	0,788–0,900

4.7 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST CEA IN CA 19-9

Preglednica XV: Kontigenčna tabela CEA in CA 19-9

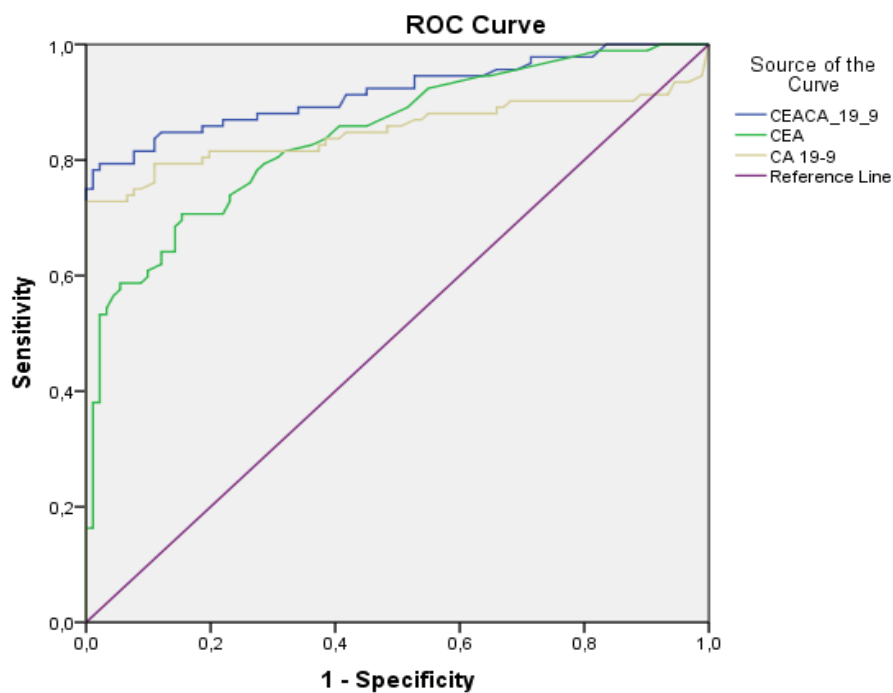
TO	BOLEZEN	
	PRISOTNA BOLEZEN	NI BOLEZNI
POZITIVEN TO ⁺	RP (45)	LP (0)
NEGATIVEN TO ⁻	LN (11)	RN (78)

Občutljivost = 80,3 %; **specifičnost** = 100 %

PNV = 3,14 %; **NNV** = 2,75 %

Preglednica XVI: Površina ROC krivulj CEA in CA 19-9

AUC	0,917
STAND. NAPAKA	0,022
VREDNOST p	0,000
INTERVAL ZAUPANJA (95 %)	0,785-0,960



Diagonal segments are produced by ties.

Graf 9: ROC krivulja CEA in CA 19-9

4.8 SPECIFIČNOST IN OBČUTLJIVOST PRI UPOŠTEVANJU POVIŠANEGA CEA ALI CA 19-9

Preglednica XVII: Kontigenčna tabela pri upoštevanju povišanega CA 19-9 ali CEA

TO	BOLEZEN	
	PRISOTNA BOLEZEN	NI BOLEZNI
POZITIVEN TO ⁺	RP (35)	LP (13)
NEGATIVEN TO ⁻	LN (57)	RN (91)

Občutljivost = 59,3 %; **specifičnost** = 87,5 %; **PNV** = 2,28 %; **NNV** = 1,93 %

Preglednica XVIII: Primerjava specifičnosti, občutljivosti, PNV, NNV

	CEA	CA 19-9	CEA in CA 19-9	CEA ali CA 19-9
Občutljivost	64 %	72,8 %	80,3 %	59,3 %
Specifičnost	86,8 %	98,9 %	100 %	87,5 %
PNV	2,6 %	3 %	3,14 %	2,28 %
NNV	2,2 %	2,45 %	2,75 %	1,93 %

5. RAZPRAVA

Rak trebušne slinavke je zelo agresiven tumor in ima slabo prognozo zaradi poznega odkritja tumorja. Tumorski označevalec z dobro občutljivostjo in specifičnostjo bi lahko bil v veliko pomoč pri ostalih diagnostičnih pristopih za čimprejšnje odkritje bolezni in zdravljenje, kar bi lahko tudi izboljšalo prognozo bolezni. Pri primerjavi koncentracij CEA in CA 19-9 pri obolelih z rakom na trebušni slinavki in pri zdravih smo izračunali vrednost $p < 0,05$ (preglednica VIII) in statistično dokazali razlike med obema skupinama. Pri skupini obolelih z rakom na trebušni slinavki so bile koncentracije TO precej višje v primerjavi s kontrolno skupino. Izračunani srednji vrednosti (preglednica III, IV), so bili pri obeh TO višji pri skupini obolelih. Iz teh podatkov lahko sklepamo, da je uporaba teh tumorskih označevalcev pri raku trebušne slinavke smiselna. Pri primerjavi koncentracij TO glede na lokacijo tumorja na trebušni slinavki nismo statistično dokazali bistvenih razlik. Pri Kruskal-Walisovem testu smo dobili vrednost $p > 0,05$ (preglednica IX), kar nam potrjuje ničelno hipotezo, da ni razlik v koncentraciji TO, glede na to, kje se tumor nahaja.

Pri izračunu specifičnosti in občutljivosti pri definirani referenčni vrednosti se je CA 19-9 izkazal za bolj zanesljivega od CEA, saj ima višjo občutljivost (72,8 %) in specifičnost (98,9 %) kot CEA. Pri CEA smo izračunali občutljivost (64%) in specifičnost (86,8 %). Glede na izračunano specifičnost in občutljivost TO lahko sklepamo, da bi bolj zanesljivo

potrdili bolezen ob povišanem CA 19-9 in izključili bolezen pri znižanem CA 19-9 kot pri CEA. PNV pri CEA je bila izračunana (2,6 %) in pri CA 19-9 (3,0 %). NNV smo dobili pri CEA (2,2 %) in pri CA 19-9 (2,45 %). PNV in NNV sta bili pri obeh TO prenizki, kar kaže na to, da sta oba TO nezanesljiva za samostojno uporabo pri presejalni diagnostiki.

Pri oceni verjetnosti bolezni pri povišanem CA 19-9 smo izračunali LR+ (66,1) in pri CEA LR+ (4,8). Iz rezultatov LR lahko razberemo da se pri obeh zvišanih TO poveča verjetnost za bolezen, saj je LR+ > 1. Pri CA 19-9 je LR+ višji, kar nam pokaže večjo verjetnost bolezni ob povišanem CEA 19-9, kot pri CEA. LR. smo pri CA 19-9 izračunali 0,27 in LR. pri CEA 0,41. Iz LR. rezultatov je razvidno, da se verjetnost za bolezen pri obeh normalnih TO zmanjša, saj pri obeh TO dobimo LR. < 1.

Pri primerjavi ROC krivulj je razvidno, da je površina pri CA 19-9 (AUC= 0,851) in pri CEA (AUC=0,844). Krivulja se pri CA 19-9 dvigne malo višje v levi zgornji kot pri CEA (graf 9), vendar pa nam interval zaupanja, ki je bil pri CA 19-9 (0,787-0,915), (preglednica XII) in pri CEA (0,788-0,900), (preglednica XIV) ne pokaže večje razlike med TO.

Z višanjem oziroma nižanjem definirane referenčne vrednosti TO lahko spreminjamo tudi občutljivost oz. specifičnost TO. Tako najdemo vrednost, pri kateri imamo optimalno kombinacijo občutljivosti in specifičnosti TO. Iz koordinat ROC krivulje CA 19-9 (priloga 3) lahko vidimo, da če bi pri CA 19-9 dvignili referenčno vrednost na 47,2 U/mL, bi lahko izboljšali specifičnost na 100 %, občutljivost pa bi ostala enaka. Pri še nadaljnjem višanju referenčnih mej (priloga 3), začne občutljivost CA 19-9 precej padati medtem, ko se specifičnost ne spremeni. Pri nižanju mejnih vrednosti od naše referenčne vrednosti bi lahko zelo zvišali občutljivost, vendar bi se specifičnost precej znižala, kar bi pomenilo, da bi tako TO zelo slabo ločil obolele od zdravih. Dobili bi večji delež lažno pozitivnih določitev. Pri koncentraciji 20,75 U/mL bi lahko pridobili na občutljivosti, dvignila bi se na 79,3 %, vendar bi izgubili malo na specifičnosti, padla bi na 89 % (priloga 3). Iz koordinat ROC krivulje iz CEA (priloga 2) lahko razberemo, da z višanjem referenčne vrednosti na 4,4 ng/mL zvišamo specifičnost CEA na 88 % medtem, ko ostane občutljivost enaka 64 %. Če mejo še zvišamo na 4,8 ng/mL, dobimo zelo dobro specifičnost, vendar se občutljivost nekoliko zniža na 60,9 % (priloga 2). To pomeni, da bomo ob negativnem CEA samo z 60,9-odstotno verjetnostjo ovrgli bolezen in tako dobili več lažno negativnih določitev kot pa pri že definirani referenčni vrednosti. Občutljivost bi

lahko nekoliko dvignili, na 70,7 %, če bi referenčno mejo spustili na 3,75 ng/mL, vendar bi pri tem nekoliko izgubili na specifičnosti CEA, padla bi na 84,6 % (priloga 2).

Pri upoštevanju obeh TO se je občutljivost dvignila na 80 % in specifičnost na 100 %. Pri ROC krivulji CEA in CA 19-9 se površina AUC zviša na 0,917 (graf 9). Upoštevanje obeh TO torej izboljša diagnostično zanesljivost in zmanjša število lažno negativnih in lažno pozitivnih rezultatov. Smiselno kombinacijo TO nam dokazuje tudi izračun korelacijskega koeficienta, ki je bil 1, kar kaže na dobro povezavo obeh TO. Korelacijski koeficient je pozitiven, kar nakazuje gibanje obeh TO v isto smer. Pri višanju koncentracije enega TO, se torej povišuje tudi koncentracija drugega TO.

Če smo pri izračunu občutljivosti in specifičnosti upoštevali samo enega povišanega izmed obeh, je bila specifičnost manjša (87,5 %), kot pri upoštevanju obeh TO. Občutljivost se je še bolj znižala in sicer na 59,3 %. Upoštevanje samo enega zvišanega TO izmed obeh bi tako precej znižalo diagnostično zanesljivost, saj bi dobili preveč lažno negativnih rezultatov. Pri negativnem TO bi komaj z 59,3-odstotno zanesljivostjo lahko ovrgli bolezen.

Kljub omejeni specifičnosti in občutljivosti CEA in CA 19-9 so tudi v več študijah potrdili njuno diagnostično uporabnost pri bolnikih z rakom trebušne slinavke. Pri CA 19-9 so različne študije dokazale korelacijo povišane koncentracije TO s stadijem tumorja. CA 19-9 se je izkazal kot neodvisen prognostičen dejavnik, kjer so povišane koncentracije TO korelirale s slabšo prognozo in obratno. CA 19-9 se je pokazal kot dober prognostični napovednik pri operiranih in neoperiranih zbolelih, kjer so vrednosti CA 19-9 korelirale z oceno preživetja. Dober odziv CA 19-9 so tudi dokazali pri zdravljenju s kemoterapijo, kjer se je pokazala boljša prognoza boleznih pri bolnikih z nižanimi vrednostmi CA 19-9. V isti raziskavi pa se je pokazala tudi močna korelacija vrednosti CA 19-9 pred zdravljenjem in preživetjem obolelih. Potrdili so tudi smiselno uporabo TO pri ugotavljanju stanja remisije tumorja po operaciji (16).

Dokazali pa so tudi diagnostične omejitve CA 19-9 zaradi LN-rezultatov pri sialil-Lewis negativnih bolnikih in LP-rezultatov pri obstruktivni zlatenici. V eni izmed študij se je kljub dobri občutljivosti 100 % in 98,5-odstotni specifičnosti CA 19-9 slabo izkazal v presejalni diagnostiki pri asimptomatskih bolnikih z rakom na trebušni slinavki z zelo nizko PNV (0,9 %). Slabša občutljivost se je izkazala v zadnjih raziskavah pri začetnih

stadijih ali manjših tumorjih, kjer so se vrednosti CA 19-9 pri tumorjih, manjših kot 3 cm, povišale samo pri polovici obolelih, kar pokaže nizko občutljivost. Prav tako so raziskave pokazale, da je težko razločevati med maligno in benigno boleznijo slinavke. Pri žolčni drenaži se vrednosti CA 19-9 znižajo (16). V študiji (42) so ugotovili, da pri vrednosti CA 19-9 > 90 po drenaži lahko lezijo opredelijo kot maligno. Zaradi mnogih omejitev so diagnostično zanesljivost CA 19-9 poskusili zvišati s kombinacijo z ostalimi TO in diagnostičnimi parametri. Nekateri avtorji so predlagali za boljšo diagnostiko pri malignih in nemalignih oblikah določevanje CA 19-9 v kombinaciji z bilirubinom in CRP. Pokazalo se je, da je bil bilirubin in CA 19-9 zvišan pri malignih obolenjih in CRP pri nemalignih. Prišli so do zaključka, da se lahko izboljša specifičnost in občutljivost z zmanjšanjem vpliva vnetja na CA 19-9 tako, da se upošteva razmerja CA 19-9/CRP (43). Boljšo klinično uporabnost CA 19-9 pa so tudi dokazali v kombinaciji z drugimi TO. V raziskavi (49) so ugotovili, da se je pri kombinaciji CEA, CA 19-9 in CA 242 izboljšala klinična zanesljivost teh TO. Bolniki z dvema ali tremi povišanimi označevalci so imeli krajši čas preživetja.

CEA se je tudi v ostalih raziskavah, kot v naši nalogi izkazal za manj zanesljivega od CA 19-9, saj njegova specifičnost in občutljivost zelo niha. Izraža se pri mnogih bolezenskih stanjih, zato je težko uvesti kriterije pri diagnosticiranju in spremljanju bolezni (47). V raziskavi pri bolnikih z Lewis AB-genotipom pa so dobili dober odziv CEA pri spremljanju odgovora z zdravljenjem (47). Dober odziv so dobili tudi v raziskavi pri bolnikih z rakom na trebušni slinavki s prisotnim diabetesom, kjer so prišli do zaključkov, da bi CEA pri vrednosti > 6 ng/mL lahko povečal diagnostično vrednotenje raka trebušne slinavke pri bolnikih z diabetesom. Povečano izločanje CEA pri bolnikih s prisotnim diabetesom naj bi bilo posledica aktivacije z beta-hidroksibutiratom, ki je prisoten pri slabo nadzorovani sladkorni bolezni (45).

6. ZAKLJUČEK

- Naši rezultati so pokazali, da je CA 19-9 klinično bolj uporaben in bolj zanesljiv kot samostojen tumorski označevalec od CEA pri bolnikih z rakom na trebušni slinavki. CA 19-9 ima boljšo občutljivost in specifičnost kot CEA.
- Pri CEA smo dobili prenizko občutljivost in specifičnost, zato lahko sklepamo, da je uporaba CEA kot samostojnega TO nezanesljiva za klinično diagnostiko pri bolnikih z rakom na trebušni slinavki.
- Specifičnost in občutljivost CEA in CA 19-9 se ob kombinirani uporabi izboljša.
- CEA in CA 19-9 sta neprimerna samostojna TO pri raku TS v presejalni diagnostiki.
- Klinična uporaba CA 19-9 in kombinirana uporaba CEA in CA 19-9 pri simptomatskih bolnikih v kombinaciji z ostalimi diagnostičnimi pristopi je smiselna.
- Pri ugotavljanju lokacije raka trebušne slinavke sta se oba TO izkazala kot neuporabna.

8. LITERATURA

1. Dahmane R: Ilustrirana anatomija, druga izdaja, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 2005: 104-5.
2. Markovič S: Interna medicina, M Košnik. et al: Bolezni prebavil V, Littera picta, Ljubljana, 2011: 576-616, 7-28.
3. Anatomy and Histology of the pancreas:
<http://jpc.k.zju.edu.cn/jcyxjp/files/ge/05/MT/0521.pdf> (dostopno: 25. 6. 2016)
4. Zorc Pleskovič, Milutinović Živin A, Petrovič D: Histologija, učbenik za študente farmacije, Inštitut za histologijo in embriologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2006: 82-3.
5. Pancreas: <http://en.wikipedia.org/wiki/Pancreas> (dostopno: 25. 6. 2016)
6. Pancreas: <https://www.innerbody.com/image/endo03.html> (dostopno 25. 6. 2016)
7. Abbas E Kitabchi, PH.D, M.D: Physiology of Endocrine Pancreas and Pathophysiology of Diabetes Mellitus. Dec 4, 2009; 6-1.
www.2ndchance.info/diabetescat-endocrinepancreas.pdf (dostopno 25.6.2016)
8. Fazlul H Sarkar, Sanjeev Banerjee, Yiwei Li: Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Prevention and Treatment. Toxicol Appl Pharmacol 2007; (3): 326-336
9. Klinični center Ljubljana. SOP NAV HTM navodilo za delo z analizatorjem Architect
10. Biologija tumorja: (dostopno: 25. 6. 2016)
https://www.google.si/?gws_rd=cr,ssl&ei=OYpUVeb3F8mw7Aazu4DY
11. www.pafi.si/Base/datoteka.php (dostopno: 28. 6. 2016)
12. J Bart M Korstra, Steven R Hustinx, G Johan A Offerhaus, A Maitra: Pancreatic Cancerogenesis. Pancreatology 2008; Maj 8(2): 110-125.
13. Donghui Li, Keping Xie, Robert Wolff, James L Abbruzzese: Pancreatic Cancer. The Lancet 2004; 363: 1049-57.
14. Pancreatic Cancer-American Cancer Society:

- www.cancer.org/pancreatic-cancer-pdf : [Pancreatic-cancer. American](#) (dostopno: 28. 6. 2016)
15. M. C. Herbst: Fact Sheet on Pancreatic Cancer. Cancer Association of South Africa, January 2015.
 16. Umshankar K. B, Ronald S Chamberlain: Serum CA19-9 as Biomarker for Pancreatic Cancer—A Comprehensive Review. Indian J Surg Oncol 2011; 88–100.
 17. Alojz Pleskovič: Rak trebušne slinavke. Klinični Zdrav Vestnik 2003; 45–8.
 18. CT- scan: https://en.wikipedia.org/wiki/CT_scan (dostopno: 28. 6. 2016)
 19. Carl A Burtis, Edvard R Ashwood: Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Second edition, W.B. Saunders, 1994: 904-897, 920-914.
 20. Novaković S: Tumorski označevalci v klinični onkologiji. Onkološki inštitut Ljubljana. Onkologija/pregledi 2000; 7–15.
 21. Michael J Duffy: Carcinoembryonic Antigen as Marker for Colorectal Cancer: Is it Clinically Usefull. Clinicall Chemistry 2001; 47 (4): 624–630.
 22. Možina B: Laboratorijska diagnostika in klinični pomen tumorskih označevalcev. Seminar za tehnike laboratorijske biomedicine, zbornik predavanj. Slovensko združenje za klinično kemijo, Celje, Jesenice, Ljubljana. 2006 (seminar)
 23. Learning imunoassay: www.drtnandpartners.com/.../learning_immunoassay.pdf. (dostopno: 15. 7. 2016)
 24. Kemiluminiscenca: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Kemiluminiscenca> (dostopno: 15. 7. 2016)
 25. www.invitron.co.uk/chemiluminescence.pdf (dostopno: 15. 7. 2016)
 26. Chemiluminescence acridinium salts. <https://www.google.com/patents/US5468646> (dostopno: 30. 7. 2016)
 27. Abbott Laboratories: Architect System Opreations Manual. Abbot laboratories, 2009: 415-407.

28. Reagenčni list Architect System CA19–9xr ref: 2K91
29. Reagenčni list Architect System CEAxr ref: 7K68
30. Klinični Inštitut za Klinično kemijo in Biokemijo, SOP, Določanje CEA Architect
31. Klinični Inštitut za Klinično kemijo in Biokemijo, SOP, Določanje CA19–9 Architect
32. Statistic Guide: <http://www.graphpad.com/guides/prism/6/statistics/> (dostopno: 15. 7. 2016)
33. Anthony K Akobeng: Understanding Diagnostic Test 1: Sensitivity, Specificity and Predictive Values. Department of Pediatric Gastroenterology. Acta Paediatrica 2006 (96); 338–341
34. Kruskal-Wallis test: <http://www.biostathandbook.com/kruskalwallis.html> (dostopno: 2. 7. 2016)
35. Neparometrični testi: <http://fkbv.um.si/images/stories/matematika/11pred-stat.pdf> (dostopno: 2. 7. 2016)
36. The Mann-Whitney U Test:
<http://teorionline.files.wordpress.com/2010/03/The-mann-whitney-u-test.pdf>
(dostopno: 2. 7. 2016)
37. Register Raka RS, Slora 2015.
www.slora.si/documents/11561/20218/Trebušna_slinavka.pdf (dostopno: 2.7.2016)
38. Karimollah Hajiiian–Tillaki: Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. Caspian J Intern Med 2013; 4 (2): 327–635.
39. https://en.wikipedia.org/wiki/Likelihood_ratios_in_diagnostic_testin (dostopno: 2. 7. 2016)
40. Rajeev Kumar, Abhaya Indrayan: Receiver Operating Characteristic (ROC) for Medical Reserchers. Department of Biostatistic and Medical Informatics. Indian Pediatrics 2011; 277-286.

41. http://www.adscience.eu/uploads/ckfiles/files/html_files/StatEL/statel_ROC_c
(dostopno: 27. 6. 2016)
42. Marrelli D, Causo S, Pedrazzani C, Neri A, Fernandes E, Marini M et al. CA19–9 Serum Levels in Obstructive Jaundice: Clinical Value in Benign and Malignant Conditions. *Am J Surg* 2009; 198 (3): 333–9.
43. La Greca G, Sofia M, Lomdardo R, Latteri S, Ricotta A, Puelo S, Russello D. Adjusting CA 19–9 Values to Predict Malignancy in Obstructive Jaundice: Influence of Bilirubin and C–reactive Proteine. *World J Gastroenterol* 2012; (18): 4150–5.
44. Duffy M J, Sturgeon C, Lamerz R, Haglund C Holubec VL, Klapdor R, et al: Tumor Markers in Pancreatic Cancer. A European Group on Tumor Markers (EGTM) Status Report. *Ann Oncol* 2010; (3): 441-7.
45. Sheng–Pang Hsu, Yu–Min Lin: Differences in serum carbohydrate Antigen 19–9 and Carcinoembryonic Antigen Levels Between Pancreatic Cancer Patients with or without Diabetes Mellitus. *Formos J Endocrinal Metab* 5 2014; 20–26.
46. Takehito Y, Shintaro Y et al.: Long Term Survival After Resection of Pancreatic Cancer: A single–center Retospect Analysis. *World J Gastroeneterol* 2015; 262–268.
47. N Bacalbasa, A Gireada: Tumor Marcers in Pancreatic Cancer–literature review. *HVM Bioflux* 2015; 7(2): 75–78.
48. Xiaoli jin, Yulian WU: Diagnostic Utility of Clinical and Biochemical Parameters in Pancreatic Head Malignancy Patient whith Normal Carbohydrate Antigen 19–9 levels. *African health Sciences* 2015; (15): 123-130.
49. Yu–Lei GU, Chao Lan, Hui Pei, Shuang–Ning Yang, Yan–Fen Liu, Li–li Xiao: Aplicative Value of Serum of CEA19–9, CEA, CA125 and CA242 in Diagnosis and Prognosis with Pancreatic Cancer Treated by Conccurent Chemoradiotherapy. *Asian Pacific of Cancer Preventin* 2015; (16): 6569–6573.
50. Krejs GJ: Pancreatic Cancer: Epidemiology and Risk Factors. *Dis. Dig* 2010; 28(2): 355–8.

51. A Ursavas, M Karada et al.: Serum Carcinoembryonic Antigen level As a Predictive Marker for Distant Metastasis in Non-small Cell Lung Cancer. Eur J Gen Med 2007; 4(3): 07–114.
52. P Ghaneh, E Costello J. P. Neoptolemos: Biology And Management of Pancreatic Cancer. Gut 2007; (56): 1134–1152.
53. Histological Structure of Pancreas: <http://www.slideshare.net/chet08/histological-structure-of-pancreas-40104874> (dostopno: 10. 7. 2016)
54. Statistika: <http://www.diameter.si/sciquest/B6.htm> (dostopno: 12. 4. 2016)
55. M Adamič Š: Temelji biostatistike, Medicinska fakulteta Univerze Edvarda Kardelja v Ljubljani, Inštitut za biomedicinsko informatiko, Ljubljana, 1989: 53–55, 89–91.

7. PRILOGA

Priloga 1: Meritve CEA (ng/mL) in CA 19-9 (U/mL) skupine A in B

SKUPINA A			SKUPINA B		
PACIENT	S-CA 19-9	S-CEA	PACIENT	S-CEA	S-CA 19-9
1	24,9	1,2	1	9,8	27370,3
2	3,3	0,8	2	14,9	5,3
3	2,6	1,3	3	7,2	2947
4	11,5	2,1	4	2,8	2
5	3,1	1,1	5	17,5	1882,7
6	12,2	1	6	7,1	2010
7	6,9	1,6	7	27,8	2412,9
8	4,9	1,2	8	30,5	5049,1
9	11,1	1,8	9	25,8	584,1
10	13,6	1,8	10	26,8	3398,4
11	3,8	1,7	11	12,5	5212,4
12	17,1	3,9	12	4,1	2345,3
13	20,5	1,8	13	395,8	6,3
14	3,6	2,4	14	4	492
15	9,9	3,5	15	2,7	248,9
16	10,6	48,2	16	7,4	61113,3
17	3,2	3,3	17	6,2	34782
18	8,8	3,7	18	70,8	64174
19	4,7	2,2	19	3,1	174,3
20	5,7	1,1	20	0,8	2624
21	12,8	2	21	8,9	30
22	10,8	1,6	22	124,4	37495
23	4,2	2	23	1,7	22,4
24	15,2	5,4	24	6,9	358
25	4,7	3,1	25	17,3	3801
26	18	0,9	26	2,5	5,7
27	35,2	0,7	27	5	1565
28	3,6	1,5	28	1110,1	4,1
29	5,8	0,6	29	3,8	2
30	7,5	0,8	30	120,4	15540
31	10,4	1,2	31	307,7	10182
32	3,2	1,6	32	47,5	2,3
33	3,8	1,3	33	11,5	1012
34	7	11,7	34	12,9	21912
35	2,5	0,9	35	15,7	120000
36	24,6	2,2	36	6,1	2,1

37	2	1,5	37	14	102394
38	22,4	0,7	38	23,5	1435
39	8,1	1,2	39	55,3	69971
40	6,8	5,2	40	3,9	2
41	4,5	1	41	413,6	120000
42	5,8	4,2	42	1,7	906
43	4,8	0,9	43	8,2	200
44	3,3	1,2	44	7,1	2,3
45	4,9	1,2	45	1,8	4216
46	7,8	1,1	46	10,3	14,4
47	4	6	47	30,3	50,9
48	20	2,7	48	29,5	2
49	30,8	6,4	49	1,5	608
50	2,1	1	50	4,9	332
51	32,6	2,1	51	2,2	2689
52	5,7	1,5	52	1,7	6275
53	2,2	2	53	4,1	8,5
54	12,4	1,2	54	6	17245
55	4,5	2,5	55	4,5	7116
56	46,5	1,9	56	11,1	2,8
57	2,7	0,7	57	86,4	118672
58	16,7	2,3	58	1,1	15,3
59	4	1,2	59	2,1	21
60	4	1,5	60	40,1	120000
61	32,3	4,7	61	6,6	24,7
62	7,9	1,6	62	53,8	765
63	2,2	0,6	63	56,1	21,7
64	12,2	2,3	64	50,8	2640
65	22,4	4,7	65	3,1	7,5
66	31,9	2	66	1,8	4,4
67	9,4	3,3	67	4	5838
68	4,8	1,1	68	2,9	77
69	3,1	5,6	69	1,9	797
70	2,1	0,6	70	2,7	589
71	5,5	3,4	71	1,6	674
72	3,3	2,3	72	1,2	47,9
73	4	2,5	73	2,3	64,1
74	3,1	1,7	74	1,3	56,3
75	9	5	75	5,8	38060
76	6,5	2,8	76	143,5	8609
77	2,6	1,9	77	8,2	85,9
78	7,4	3,3	78	1079,3	120000
79	4,9	1,3	79	4,5	353,6

80	2,8	1,4	80	4,7	558,4
81	3,2	1	81	270,8	120000
82	4,1	2,6	82	13,4	4502
83	5,3	1,7	83	38,6	21,1
84	10,9	0,6	84	2,4	23692
85	20,1	2,8	85	19,6	4367
86	3,2	2,3	86	6,1	98510
87	2,3	1,8	87	2,8	2
88	7,3	4,4	88	2,6	8
89	15,6	6,1	89	2,1	78,6
90	11,2	2,8	90	1,2	71,2
91	4,6	1,3	91	43,7	120000
			92	10,1	326,6

Priloga 2: Koordinate ROC krivulje pri CEA

CEA (ng/mL)	OBČUTLJIVOST	1- SPECIFIČNOST
,400	1,000	1,000
,650	1,000	,956
,750	1,000	,923
,850	,989	,901
,950	,989	,868
1,050	,989	,824
1,150	,978	,780
1,250	,957	,692
1,350	,946	,648
1,450	,946	,637
1,550	,935	,593
1,650	,924	,549
1,750	,891	,516
1,850	,870	,473
1,950	,859	,451
2,050	,859	,407
2,150	,837	,385
2,250	,826	,363
2,350	,815	,319
2,450	,804	,308
2,550	,793	,286
2,650	,783	,275
2,750	,761	,264

2,850	,739	,231
3,000	,728	,231
3,200	,707	,220
3,350	,707	,187
3,450	,707	,176
3,600	,707	,165
3,750	,707	,154
3,850	,696	,154
3,950	,685	,143
4,050	,663	,143
4,150	,641	,143
4,300	,641	,132
4,450	,641	,121
4,600	,620	,121
4,800	,609	,099
4,950	,598	,099
5,100	,587	,088
5,300	,587	,077
5,500	,587	,066
5,700	,587	,055
5,900	,576	,055
6,050	,565	,044
6,150	,543	,033
6,300	,533	,033

Priloga 3: Koordinate ROC krivulje pri CEA 19-9

CEA 19-9 U/mL	OBČUTLJIVOST	1-SPECIFIČNOST
1,000	1,000	1,000
2,050	,946	,989
2,150	,935	,967
2,250	,935	,945
2,400	,913	,934
2,550	,913	,923
2,650	,913	,901
2,750	,913	,890
2,950	,902	,879
3,150	,902	,846
3,250	,902	,802
3,450	,902	,769

3,700	,902	,747
3,900	,902	,725
4,050	,902	,681
4,150	,891	,670
4,300	,891	,659
4,450	,880	,659
4,550	,880	,637
4,650	,880	,626
4,750	,880	,604
4,850	,880	,582
5,100	,880	,549
5,400	,870	,538
5,600	,870	,527
5,750	,859	,505
6,050	,859	,484
6,400	,848	,484
6,650	,848	,473
6,850	,848	,462
6,950	,848	,451
7,150	,848	,440
7,350	,848	,429
7,450	,848	,418
7,650	,837	,407
7,850	,837	,396
7,950	,837	,385
8,050	,826	,385
8,300	,826	,374
8,650	,815	,374
8,900	,815	,363
9,200	,815	,352
9,650	,815	,341
10,150	,815	,330
10,500	,815	,319
10,700	,815	,308
10,850	,815	,297
11,000	,815	,286
11,150	,815	,275
11,350	,815	,264
11,850	,815	,253
12,300	,815	,231
12,600	,815	,220
13,200	,815	,209

14,000	,815	,198
14,800	,804	,198
15,250	,804	,187
15,450	,793	,187
16,150	,793	,176
16,900	,793	,165
17,550	,793	,154
19,000	,793	,143
20,050	,793	,132
20,300	,793	,121
20,750	,793	,110
21,050	,783	,110
21,400	,772	,110
22,050	,761	,110
23,500	,750	,088
24,650	,750	,077
24,800	,739	,077
27,450	,739	,066
30,400	,728	,066
31,350	,728	,055
32,100	,728	,044
32,450	,728	,033
33,900	,728	,022
40,850	,728	,011
47,200	,728	,000
49,400	,717	,000
53,600	,707	,000
60,200	,696	,000
67,650	,685	,000
74,100	,674	,000
77,800	,663	,000
82,250	,652	,000
130,100	,641	,000
187,150	,630	,000
224,450	,620	,000
287,750	,609	,000

