

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

KLAVDIJA PLEVNIK

**KLINIČEN POMEN DOLOČANJA KROMOGRANINA A
PRI KARCINOIDNIH TUMORJIH**

Ljubljana, 2008

IZJAVA

Podpisana Klavdija Plevnik, rojena-a 29. 09. 1983 v Celju, študentka Fakultete za farmacijo v Ljubljani, smer laboratorijska biomedicina, izjavljam, da je diplomsko delo z naslovom Kliničen pomen določanja kromogranina A pri karcinoidnih tumorjih, samostojno izdelano pod vodstvom prof. dr. Joška Osredkarja .

ZAHVALA

Za vso strokovno pomoč, prijazne besede in koristne nasvete pri izdelavi diplomske naloge se zahvaljujem mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju.

Iskrena zahvala gre tudi staršema, ki sta me spodbujala in verjela v moj uspeh, ter gospe Nadji Pavušek za vse spodbudne besede.

Kratice uporabljene v tej diplomski nalogi:

CEA - karcioembrionalni antigen

AFP - alfafetoprotein

β - HCG - beta horionski gonadotropin

PSA - za prostato specifični antigen

CA -125- karcinomski antigen 125

CA15 -3 - karcinomski antigen 15-3

CA19-9 - karcinomski antigen 19-9

PKF - prostatična kislina fosfataza

AF - alkalna fosfataza

LDH - laktatdehidrogenaza

TG - tiroglobulin

Pt-Ag - nezaznamovani kompleks protitelo-antigen

PGE - polietilen glikol

Ag* - zaznamovan antigen določene koncentracije

Pt - protitelo

Pt - Ag* - zaznamovani kompleks protitelo - antigen

Ag - nezaznamovani antigen standardne ali neznane koncentracije

CT - računalniška tomografija

MRS - magnetnoresonančno slikanje

KgA - kromogranin A

CGA - koncentracija kromogranina A

NET - nevroendokrini tumorji

pg - pikogram

Ca²⁺ - kalcij

RIA - radioimunska tehnika

TE - celokupna napaka

AE - absolutna napaka

LOD - meja zaznave

SL - slepi vzorec

Asl - absorbanca slepega vzorca

SDsl - standardni odklon slepega vzorca

ng/L - nanogram na liter

RE - relativna napaka

S0 - koncentracija standardnega pripravka

Cizm - izmerjena koncentracija

Cpr - podana vrednost koncentracije

KV, CV - koeficient variacije

Xp - aritmetična sredina

SD - standardna deviacija

n - število meritev

Xi - rezultat posameznih meritev

CA - točka celotne radioaktivnosti

Ab1 - primarno protitelo

Ab2 - sekundarno protitelo

H³ - tricij

cpm - mera pri scintilacijskem števcu izražena v številkah na minuto

¹²⁵I - jod 125

KAZALO

KAZALO.....	5
I. UVOD	6
1.1. Rak.....	6
1.1.1 Rak in imunski sistem	7
1.1.2. Tumorski antigeni.....	7
1.1.2.1. Tumorski označevalci.....	7
1.1.2.2. Določanje tumorskih označevalcev	8
1.1.2.3. Lastnosti idealnih tumorskih označevalcev	9
1.1.2.4. Pomanjkljivost tumorskih označevalcev	9
1.1.2.5. Kdaj določiti tumorske označevalce.....	10
1.1.2.6. Delitev tumorskih označevalcev.....	10
1.1.3. Diagnosticiranje raka.....	12
1.2. Karcinoid.....	13
1.2.1 Diagnostične preiskave pri boleznih prebavil	13
1.3. Kromogranin.....	14
1.3.2. Referenčne vrednosti	15
1.3.3. Biosinteza	16
1.4. Uravnavanje biosinteze in izločanje KgA	16
1.5. Delovanje.....	18
1.6. Nevroendokrini tumorji	18
1.7.1. Radioimunski testi	20
1.7.2. Encimsko imunski testi.....	20
II. NAMEN DELA	22
III. EKSPERIMENTALNI DEL	23
3.1. Uporabljena metoda za določanje kromogranina A v tej diplomski nalogi	23
3.1.1. Postopek analize za določanje kromogranina A.....	23
3.1.1.1. Material, ki je potreben za analizo.....	23
3.1.1.2. Radioimunsko določanje antigena z metodo dveh protiteles	23
3.1.1.3. Protokol (postopek, princip).....	26
3.1.1.4. Reagenti	27
3.1.1.5. Ocena kvalitete rezultatov	28
3.1.1.5.1. Omejitev postopka.....	30
3.1.1.5.2. Pričakovane vrednosti	31
IV. REZULTATI.....	33
V. REZPRAVA	40
VI. SKLEP.....	42
VII. VIRI IN LITERATURA	43

I. UVOD

1.1. Rak

Rakava celica je tista, ki je izgubila normalne nadzorne mehanizme in zato nekontrolirano raste. Rak lahko nastane iz vsakega tkiva v kateremkoli organu. Z rastjo in delitvijo rakavih celic se oblikujejo gmote rakavega tkiva, ki rastejo (»vdirajo«) v sosednja tkiva in se lahko razširijo (»zasevajo«, »metastazirajo«) po telesu (1).

Rakave celice se razvijejo iz normalnih celic s procesom transformacije. Prva faza tega dogajanja je iniciacija, pri kateri sprememba v celičnem genskem materialu povzroči, da postane celica rakava. Spremembo povzroči agens, ki ga imenujemo karcinogen – takšne so na primer različne kemične spojine, nekateri virusi, ionizirano sevanje ali sončna svetloba. Naslednja faza je promocija (»napredovanje«), ko začetna prizadeta celica postane rakava (1).

Za nastanek raka je potrebnih več dejavnikov, pogosto kombinacija občutljive celice in karcinogena.

Med dogajanjem, med katerim normalna celica postane rakava, se vedno spremeni tudi DNK. Spremembe v celičnem genskem materialu dostikrat težko odkrijemo, čeprav nas včasih spremembe velikosti in oblike posameznega značilnega kromosoma navajajo na določeno obliko raka (1).

Tabela 1: Karcinogeni: snovi, ki lahko povzročajo raka

SNOV	MESTO RAKA
Azbest	Pljuča, poprsnica
Alkohol	Požiralnik, usta, žrelo
Tobak	Vrat, pljuča, požiralnik, sečni mehur
Alkilirajoče snovi	Levkemija, sečni mehur
Nikelj	Pljuča, obnosne votline
Benzen	Levkemija

1.1.1 Rak in imunski sistem

Telesni imunski sistem ne napada in ne odstranjuje le bakterij in drugih tujih snovi, ampak tudi rakave celice. Rakava celica sicer ni tuja, le njena biološka funkcija se je tako spremenila, da ne odgovarja na normalne telesne mehanizme za uravnava rasti in delitev celice. Zato se nenormalna celica razvija še naprej; posledica je rak (2).

1.1.2. Tumorski antigeni

Antigen je tuja snov, ki jo imunski sistem prepozna in zaznamuje za uničevanje. Antigene najdemo na površini vseh celic, toda običajno lastni imunski sistem ne reagira na svoje celice. Ko postanejo celice rakave se na njihovi površini pojavijo novi, imunskemu sistemu tuji antigeni. Imunski sistem lahko te nove tako imenovane tumorske antigene prepozna kot tuje in včasih lahko zadrži ali uniči rakave celice. Toda tudi povsem delujoč imunski sistem ne more vedno uničiti vseh rakavih celic (3).

Nekatere tumorske antigene lahko koristno izrabimo. Take, ki se pri določenih rakih sproščajo v kri, lahko odkrijemo s krvnimi testi in jih včasih imenujemo tumorski označevalci (1).

1.1.2.1. Tumorski označevalci

To so snovi, ki so produkti malignih celic ali snovi, ki so nastale v drugih celicah pod vplivom delovanja malignih celic. Določamo jih v telesnih tekočinah, najpogosteje v serumu in plazmi. Tumorski označevalci so lahko nosintetizirane snovi, takšnih v zdravem organizmu ne najdemo, ali pa snovi, ki so prisotne v veliko manjših količinah. Določanje tumorskih označevalcev nam lahko pomaga pri diagnozi bolezni, napredovanju njenega poteka, pri določanju stadija bolezni, izbiri načina zdravljenja ter pri zgodnjem odkrivanju ponovitve in razširitve bolezni (1).

1.1.2.2. Določanje tumorskih označevalcev

Koncentracija ali sprememba koncentracije tumorskih označevalcev v krvi in ostalih telesnih tekočinah je odvisna od številnih dejavnikov:

- Števila celic, ki proizvajajo tumorske označevalce, in s tem od velikosti tumorja, njegove razširjenosti, stadija,
- hitrosti sinteze,
- hitrosti sproščanja iz tumorskih celic ali celičnih površin,
- stopnje izražanja tumorskih označevalcev (če posamezen tumor ne izraža označevalca, tudi ne mora priti do njegovega povišanja),
- tipa tumorja (tumorske celice sicer lahko izražajo označevalce, vendar ni nujno, da se ta sprošča v telesne tekočine),
- prekrvavljenosti tumorja (pri slabi oskrbi tumorja s krvjo pride v krvni obtok manjši delež označevalca),
- stopnje nekroze tumorskega tkiva (obsežna liza celic povzroči povišanje ravni tumorskega označevalca),
- razpolovnega časa tumorskega označevalca,
- vpliva protiteles (lahko nastanejo imunski kompleksi in hitrosti izločanja označevalcev je nato odvisna od velikosti kompleksov) (4).

Tumorski označevalci se nahajajo v telesnih tekočinah v zelo majhnih koncentracijah, zato za njihovo določanje potrebujemo visoko občutljive metode. Najbolj razširjene metode so radioimunološka, encimimunološka in luminometrična. Vse našteje metode so prilagojene določanju izredno majhnih koncentracij antigena.

Specifičnost metod je odvisna predvsem od kakovosti protiteles. Vrednosti tumorskih označevalcev so odvisne od metode, s katero jih določamo. Za lažjo interpretacijo rezultatov je treba napraviti več določitev tumorskih označevalcev v različnih stadijih bolezni, ter spremljati gibanje njihovih koncentracij.

Pri tem je treba upoštevati biološko razpolovno dobo, ki se spreminja od označevalca do označevalca in se giblje od nekaj ur do nekaj tednov (4).

1.1.2.3. Lastnosti idealnih tumorskih označevalcev

Idealen označevalec naj bi bil prisoten le v tumorskih celicah, značilen naj bi bil za organ in vrsto tumorja, določljiv v serumu vseh bolnikov z istim tipom tumorja, tvoril naj bi se v zadostnih količinah in bil dokazljiv v serumu že na začetku razvoja tumorja, njegove serumske koncentracije pa naj bi odražale dinamiko rasti tumorske mase oziroma velikost tumorske mase (4).

Vlogo in vrednost posameznega tumorskega označevalca ter metode za določeno vrsto rakave bolezni natančno opredelimo s pojmom občutljivost in specifičnost. Občutljivost označevalca pove, pri kolikšnem deležu bolnikov z nekim tumorjem je raven označevalca povišana. Čim večji je delež bolnikov z istovrstnim tumorjem, pri katerih je raven povišana, tem bolj občutljiv je označevalec. Pri takem označevalcu pričakujemo tudi zelo majhno število lažno negativnih določitvev. Specifičnost predstavlja delež preiskovancev, ki nimajo nekega rakavega obolenja in imajo normalno koncentracijo tumorskega označevalca.

Idealni tumorski označevalec naj bi imel 100 odstotno občutljivost in specifičnost za neko rakavo obolenje, njegova referenčna vrednost pa naj bi bila 0 (4).

1.1.2.4. Pomanjkljivost tumorskih označevalcev

Idealnega tumorskega označevalca še ni, saj snovi, ki jih uporabljamo za tumorske označevalce, ne nastajajo samo in izključno kot spremljevalci rakavega procesa. Pomanjkljivosti doslej znanih tumorskih označevalcev so:

- Nezadostna specifičnost za neko vrsto rakave bolezni,
- tvorba označevalcev v velikih koncentracijah pri nerakavih procesih (različna vnetja, benigni tumorji, bolezni jeter in trebušne slinavke),
- tvorba pri različnih fizioloških stanjih (nosečnost, menstruacija, laktacija),

- tvorba v povsem zdravih tkivih (4).

1.1.2.5. Kdaj določiti tumorske označevalce

Tumorske označevalce določimo:

- Pred operativnim posegom, pred kakršnimkoli drugim zdravljenjem (obsevanjem, kemoterapijo, hormonsko ali biološko terapijo),
- po operativnem posegu, med zdravljenjem in po končanem zdravljenju enkrat na 3 do 6 mesecev do drugega leta, pozneje pa enkrat na leto oziroma ob rednih pregledih,
- ob sumu na ponovitev ali napredovanje bolezni,
- pred spremembo terapije,
- najmanj tri tedne po začetku nove terapije,
- 2 do 3 tedne po določitvi povečanih koncentracij tumorskega označevalca (4).

1.1.2.6. Delitev tumorskih označevalcev

Označevalce lahko razdelimo na več načinov: po kemični zgradbi, po mestu nastanka, po vrsti tumorskih bolezni, pri katerih naj bi jih določali. Najpogosteje uporabljena razdelitev poskuša strniti njihove biokemične lastnosti, mesto nastanka in funkcionalnost (2).

Po tej delitvi ločimo:

- Onkofetalni proteini,
- hormoni in/ali karcinoplacentarni antigeni,
- encimi,
- tumor spremljajoči antigeni,
- posebni serumski proteini,
- mešani označevalci.

Lahko jih delimo tudi glede na mesto določitve. Humoralni tumorski označevalci so določeni v krvi in ostalih telesnih tekočinah, celični tumorski označevalci pa v celicah ali na površini celic (1)

Onkofetalni proteini:

Karcinoembrionalni antigen (CEA) je tumorski antigen, ki se nahaja v krvi oseb z rakom na debelem črevesu, dojki, trebušni slinavki, mehurju, jajčnikih ali materničnem vratu.

Alfafetoprotein (AFP), ki ga normalno tvorijo zarodkove jetrne celice, najdemo v krvi bolnikov z jetrnim rakom (hepatomom). Najdemo ga tudi pri ljudeh z določenimi raki na jajčnikih ali modih in pri otrocih ter mladih s tumorjem epifize (1).

Hormoni:

Beta humani horionski gonadotropin (β -HCG), gre za polipeptid, ki ga uvrščamo v posebno skupino karcinoplacentarnih antigenov - proteinov,) nastajajo v placenti med nosečnostjo in so pri odraslih prisotni le izjemoma. Na določanju tega hormona temelji večina preskusov za zgodnje odkrivanje nosečnosti.

Tumor spremljajoči antigeni:

Prostato specifični antigen (PSA) je velik protein, serinska proteaza, prvič izolirana iz ekstrakta tkiva prostate in serumske tekočine. Po tvorbi v tkivu prostate se izloča v semensko tekočino, kjer doseže izredno velike koncentracije. Vloga te serumske proteaze je preprečiti koagulacijo serumske tekočine. Pri zdravih osebah preidejo v krvni obtok le majhne količine PSA, tako da je njihova koncentracija v serumu zanemarljiva. Pri bolnikih s patološkimi spremembami prostate, zlasti z rakom, pa se količine, ki preidejo v krvni obtok, močno povečajo. S tem se značilno poveča tudi koncentracija v serumu.

CA 125- karcinomski antigen 125 je značilen označevalec za raka jajčnikov. Je glikoprotein in nastaja pri več kot 80 odstotkih bolnic z nemucinoznim rakom jajčnikov. Med embrionalnim razvojem nastaja v celoskmem epiteliju, celicah plevre. Pri odraslih je prisoten v sluznici materničnega vratu in pljučnem paranhimu, zanimivo pa je, da nastaja v zdravem tkivu jajčnikov.

CA 15-3 - karcinomski antigen 15-3 je ogljikovodikov antigen. Določimo ga z dvema različnima monoklonskima protitelesoma, ki sta sposobni vezave na različna mesta antigena. Nastaja v sekretornem epiteliju dojk, pljuč, gastrointestinalnih organov, maternice in je pogosto v izločkih zdravih odraslih oseb. Povečane koncentracije zasledimo predvsem pri bolnicah z rakom dojk.

CA 19-9 - karcinomski antigen 19-9 je glikopeptid, ki ni niti tkivno niti organsko specifičen. Povečan je v serumu bolnikov z gastrointestinalnimi tumorji. Označevalec je sicer nekoliko bolj specifičen za raka trebušne slinavke in jeter, pogosto pa so serumske koncentracije povečane tudi pri bolnikih z rakom debelega črevesa, danke, želodca in jajčnikov (2).

Encimi:

Prostatična kislina fosfataza (PKF) nastaja v normalnem tkivu prostate.

Alkalna fosfataza (AF) obstaja kot vrsta izoenzimov, ki nastajajo v jetrih, kosteh in placenti.

Laktatdehidrogenaza (LDH) nespecifičen encimski označevalec, pogosto je povišan v serumu bolnikov z limfomi (4).

Posebni serumski proteini:

Tiroglobulin (TG) je znotraj celični glikoprotein, odgovoren za nastanek in shranjevanje tiroksina. Izloča ga žleza ščitnica.

Beta-2-mikroglobulin je protein. Povečane serumske koncentracije ugotovimo pri bolnikih z rakom pljuč, dojke, trebušne slinavke, debelega črevesa in danke, z limfomi ter kronično limfocitno levkemijo.

S-100 protein so prvič izolirali v govejih možganih. Poleg tega, da je možganski označevalec, ga najdemo tudi različnih tkivih (4).

1.1.3. Diagnosticiranje raka

Obravnavo bolnika z rakom začnemo z anamnezo (zgodovino bolezni) in telesnim pregledom. Oboje pomaga zdravniku pri oceni ogroženosti zaradi raka in izbiri potrebnih

preiskav. Na splošno je pri rutinskem telesnem pregledu treba zaradi suma na raka posebej pogledati ščitnico, moda, usta, jajčnike, kožo in bezgavke.

Presejalni testi poskušajo odkriti raka, še preden povzroči simptome. Če je izvid presejanja pozitiven, so za potrditev diagnoze potrebne še nadaljnje preiskave. Za diagnozo pogosto odvzamemo tudi tkivo. Nujno je treba tudi določiti specifični tip raka (5).

1.2. Karcinoid

Karcinoid je rak, ponavadi v prebavilih, ki lahko izloča neuropeptide in amine s hormonskimi učinki. Karcinoidni tumorji izločajo obilico neuropeptidov in aminov, (hormonom podobnih snovi) na primer: histamin, prostaglandin, serotonin. V normalnih količinah sodelujejo pri delovanju notranjih organov, ob presežku pa se pokažejo znaki karcinoidnega sindroma (pordevanje, modrikasta koža, krči v trebuhu, driska, prizadetost srca) (5).

Karcinoidni tumorji v prebavilih sproščajo hormone snovi v kri, ki jih odnese neposredno v jetra, kjer jih encimi uničijo. Zasevki tumorjev v jetrih pa te snovi izločajo naravnost v veliki krvni obtok, ne da bi se prej razgradile v jetrih. Zato karcinoidni tumorji v prebavilih praviloma ne povzročajo simptomov, dokler se ne razširijo v jetra. Ko se to zgodi, pa hormone snovi zakrožijo po telesu in povzročijo simptome karcinoidnega sindroma, ki se razlikujejo glede na to, katere snovi nastajajo (1).

1.2.1 Diagnostične preiskave pri boleznih prebavil

Pri preiskavah, ki se uporabljajo za prebavila, lahko uporabljamo endoskop (pregledovalna cevka iz optičnih vlaken, ki se uporablja za ogled notranjih struktur in odvzem tkivnih vzorcev iz notranjosti telesa), rentgensko slikanje, ultrazvočni pregled, radioaktivne sledilce in kemične meritve. Te preiskave pomagajo postaviti diagnozo, locirati in včasih tudi zdraviti bolezen (2).

Če zdravnik sumi na karcinoidni tumor, izmeri vrednost 5-hidroksi indol očetne kisline v urinu, ki ga bolnik zbira 24 ur. Vsaj tri dni pred preiskavo bolnik ne sme jesti s serotoninom bogatih živil (banane, paradižnik, avokado, ananas, jajčevci in orehi).

CT (računalniška tomografija) in MRS (magnetnoresonančno slikanje) pokažeta ali se je tumor razširil v jetra. Za določanje lokacije in velikosti tumorja je včasih potrebna eksploracijska operacija v trebuhu. Dva novejša in pomembna načina za ugotavljanje tumorja in njegove rasti sta arteriografija in radionuklidno slikanje (1).

1.3. Kromogranin

Pred dobrimi tremi desetletji so v kromafinih celicah sredice goveje nadobistnice (nadledvične žleze) našli in opisali nenavadna obarvana zrnca in jim dali ime kromogranini. Naslednji raziskovalci so ugotovili, da jih kromafine celice ne le sintetizirajo, ampak tudi hkrati izločajo v kri s svojimi specifičnimi izločki. Danes, po tolikih letih od prvih opisov, še vedno ne poznamo glavnega fiziološkega pomena teh kromograninov, čeprav po drugi strani dobro poznamo njihovo biokemično in gensko sestavo in nekatere učinke ter jih merimo kvantitativno v serumu pri številnih patoloških procesih (6).

1.3.1. Splošno o kromograninih

Kemično so kisli glikoproteini topni v vodi, bogati z glutaminsko kislino (25%), aspartatno kislino in prolinom (10%). Sposobni so vezanja kalcija in preprostega glikoziliranja, fosfatiliranja in sulfatiranja. Vsi imajo po več dibazičnih aminokislin (v eni molekuli kromogranina A (KgA) jih je 8 – 14), ki so pripravno mesto za njihovo morebitno poteolitično cepitev.

Zato nekateri menijo, da so kromogranini predstopnja različnih biološko aktivnih peptidov. Z svojimi biološkimi značilnostmi in klinične diagnostične uporabnosti je najpomembnejši med njimi KgA (7).

H ₂ N-peptid-vazostatin (1-76)-betagranin (1-113)-kromostatin (124-143)-pankreastatin (247-293)-parastatin (347-439)-COOH

Slika 1: Poenostavljena shematična struktura človeškega kromogranina A (v oklepajih so zaporedja aminokislin).

Koncentracijo serumskega kromogranina A merimo z encimskim imunoabsorbentnim testom in z radioimunskim testom. Občutljivost imunoabsorbentnega testa je 1 pg (pikogram) radioimunskega testa pa 100 pg. Kromogranin A (KgA) je zanesljiv in najbolj občutljiv biološki označevalec večine neuroendokrinih tumorjev (NET). KgA je v vsaki neuroendokrini celici. Celice, ki niso neuroendokrinega izvora, nimajo KgA, npr. folikularne celice ščitnice, celice skorje nadobistnice, ki izločajo steroidne hormone in spolne celice. KgA pa vselej najdemo v kromofilnih celicah sredice nadobistnice, endokrinih celicah sprednje hipofize, parafolikularnih celicah ščitnice, otočnih celicah trebušne slinavke, neuroendokrinih celicah bronhusov in prebavne cevi, enterokromofilnih celicah prostate, Merklvih celicah kože (8).

Pozitivno se obarvajo tudi enterokromafine celice pri kroničnem gastritisu. Najdemo ga tudi v celicah vranice, bezgavk in priželjca. Prav tako tudi v živčnem tkivu. Ugotovili so ga v možganski skorji in možganski sredici, v sprednji in srednji hipofizi. Je tudi v motoričnih lumbalnih celicah in v živčnih končičih, v skeletnih mišicah ter v perifernem simpatičnem živčevju (9).

1.3.2. Referenčne vrednosti

Referenčne vrednosti KgA v serumu odraslega človeka naj bi bile v območju med 20 in 100 μ g/L seruma. Različni avtorji navajajo za normalne različne vrednosti, čeprav dosežene z isto metodo, večinoma radioimunsko. O vzrokih za te odklone lahko samo ugibamo (6).

Referenčne vrednosti so torej različne. Nobles razločuje referenčne vrednosti glede na starost in spol človeka. Tako imata oba spola v starosti od 6 do 50 let povprečno koncentracijo $90 \pm 24 \mu\text{g/L}$, moški starejši od 50 let 106 ± 22 , ženske nad 50 let pa $110 \pm 36 \mu\text{g/L}$.

Vrednosti odklona pa so pomembne pri preračunavanju odstotka zvečanja in zmanjšanja koncentracije KgA pri posamezni bolezni in posameznem avtorju. Zato je dobro pri

ustreznem navajanju poleg absolutnih številčk vselej upoštevati odstotek zvečanja oziroma zmanjšanja pri posameznem avtorju za posamezno bolezen oziroma tumor (9).

So pa že opisani spodrsaljaji pri tolmačenju koncentracij KgA. Napačno pozitivne povišane koncentracije so videli pri bolnikih z okvaro ledvic, okvaro jeter, pri atrofičnem gastritisu in pri vnetni črevesni bolezni. Tudi bolniki, ki jemljejo zaviralce protonske črpalke, imajo lažen porast koncentracije KgA zaradi hiperplazije želodčnih enterokromafilnih celic po hipergastrinemiji. Zelo velik telesni napor ali telesna travma do dvakrat zveča koncentracijo KgA (6).

Pri človeku je največja zaloga KgA v sredici nadledvične žleze (nadobistnice). V hipofizi je četrt te količine (kar je presenetljivo veliko), v trebušni slinavki, želodcu in črevesju po 5 %, v drugih endokrinih žlezah pa manj kot 1 %. Poleg tega so našli KgA v razpršenih neuroendokrinih celicah v raznih organih, na primer v prostati, pljučah in dojkah in še drugod (vranici, bezgavkah) (6).

1.3.3. Biosinteza

Verjetno je za KgA le en gen. Človeški gen sestavlja 8 eksonov, lokus in na kromosomu 14q32 in je tak pri vseh živalskih vrstah. Sinteza kromogranina ni odvisna od sinteze ustreznega hormona oziroma neuropeptida v mešičku. Sintezo močno zvišajo steroidi, zlasti kortikosteroidi. V poskusu po hipofizektomiji upade sinteza KgA zaradi atrofije nadledvične žleze zaradi pomanjkanja kortikosteroidov. In nasprotno: poskusno dajanje kortizola je zvečalo koncentracijo KgA. Mehanizem vplivanja kortizola na indukcijo biosinteze KgA ni znan. Estrogen pospešuje sintezo v hipofizi, ne pa v nadledvični žlezi. Hipoglikemija po inzulinu je močan dražljaj za izločanje KgA iz nadledvične žleze, serumsko koncentracija KgA se je zvečala 1,7 – do 14-krat (9).

1.4. Uravnavanje biosinteze in izločanje KgA

Hkrati z ustreznimi hormoni in neuroendotransmitorji se iz neuroendokrinih celic izloča tudi KgA, na primer po draženju sredice nadledvične žleze. Podobno zmanjšanje koncentracije Ca^{2+} v serumu hkrati z izločanjem paratireoidnega hormona pritegne tudi

izločanje KgA. Kompenzacijsko se nato zveča sinteza KgA. Pri tem je odločilnega pomena sprostitvev znotrajceličnega Ca^{2+} . Na tak način delujejo tudi drugi aktivatorji sinteze KgA, naprimer bradikinin, prostaglandin E2 in angiotenzin II. Ti dejavniki ne vplivajo na izločanje, ampak le na kopičenje KgA v celici. Neodvisno od teh dejavnikov delujejo steroidni hormoni. Glukokortikoidni spodbujajo, estrogeni pa zavirajo gensko ekspresijo za KgA v hipofizi, ravno nasprotno pa vplivajo na sintezo ustreznega hormona. Glukokortikoidi spodbujajo, estrogeni pa zavirajo gensko ekspresijo za KgA v hipofizi, ravno nasprotno pa vplivajo na sintezo ustreznega hormona. Vendar so ti učinki nestanovitni, odvisni so od različnih dejavnikov v celici. Po dolgotrajnejšem dajanju verapamila pa se zmanjša serumska koncentracija tako KgA kot kateholaminov.

Ker so peptidi iz KgA zelo agresivni, domnevamo da sodelujejo pri uravnavanju izločanja ustreznega peptidnega hormona. Zakaj pa bi endokrini celici zavirala sproščanje lastnega transmittorja in s tem zavirala njegovo delovanje, ostaja čudno in nepojasnjeno. Koeslag je postavil domnevo, da gre za obliko homeostaze s protieuravnavanjem. Verjetno obstaja časovni zamik med učinkom nadzorne spremenljivke in nasprotnega uravnalnega dejavnika, katerega odgovor variira med obema. Tako naj bi nasprotno uravnani par hormonov vodil nadzor nad koncentracijo glukoze v krvi.

Drug primer : majhne vrednosti serumskega kalcija spodbujajo izločanje paratieroidnega hormona iz paratireoidnih žlez, hkrati pa zavirajo izločanje kalcitonina iz ščitnice. Z naraščajočimi vrednostmi serumskega kalcija se zmanjša izločanje paratireoidnega hormona, zveča pa kalcitonina, oboje skoraj linearno. Izločanje obeh hormonov pa zavira KgA, odvisno od odmerka.

Skratka medsebojno učinkovanje para nasprotno uravnajočih hormonov, ki se hkrati izloča v kri s statinom, ki je sposoben, da zavre oba člana, povzroča fiziološko ravnovesje. To razloži, da ta sistem vsak odmik od ravnotežja avtomatično, preprosto in grobo povrne v prvotno ravnovesje. Rezultat je homeostaza. Dosežena je brez živčnega sodelovanja. Ta zamisel ne samo da razloži, zakaj je nasprotno uravnavana hormonska kontrola tako splošna v homeostazi, ampak tudi prvič do zdaj, skuša pojasniti temeljni fiziološki pomen peptidov, izhajajoč iz KgA. Pove tudi, zakaj pomanjkanje vsaj enega v nasprotno urejevalnem paru hormonov zapusti uničujoče posledice. Homeostaza je uničena. Hkrati

nam pove, da se ravnotežje v protieuravnalnem sistemu ne da rekreirati, s hormonskim nadomestnim dajanjem (6).

1.5. Delovanje

Najbolj preučevano področje delovanja KgA je, da je KgA predstopnja aktivnih peptidov. Številni peptidi, ki izhajajo iz KgA, to potrjujejo. Ker pa so našli KgA tudi v tistih nevroendokrinih zrnih, ki ne vsebujejo kateholaminov, zato je odpadla teorija o delovanju KgA. In sicer, da vpliva izključno na vezavo kateholaminskih molekul v mešičku, saj vpliva tudi na genezo sekretornih zrn v nevroendokrinih celicah.

KgA veže v mešičkih kar veliko kalcija (152 nmolov na mg beljakovine).

Zanimivo je vprašanje, kakšne so te funkcionalne posledice te vezave kalcija s KgA? Mogoče KgA deluje kot beljakovina pri koncentriranju hormonov. S tem bi kalcij zvečeval vezavo kateholaminov na KgA (8).

KgA naj bi znotrajcelično:

- bil predstopnja biološko aktivnih peptidov,
- vezal kalcij in kateholamine,
- zaviral serinsko proteazo,
- induciral sintezo mešičkov in jih stabiliziral proti rupturi.

1.6. Nevroendokrini tumorji

So novotvorbe, ki rastejo počasi in so klinično včasih težko ugotovljive. Izdelujejo in izločajo biološko aktivne snovi, ki so odgovorne za dostikrat hude simptome. Hormone in peptide, sproščene iz biološko aktivnih NET (nevroendokrini tumorji), uporabljamo kot označevalce tumorja. KgA ima veliko specifičnost, zato ga uspešno uporabljamo za diagnozo, prognozo in sledenje NET. To se je posebej izkazalo pri karcinoidih NET v prebavni cevi, kjer se je KgA izkazal kot najbolj zanesljiv in natančen. KgA je tudi uporaben test za označevanje NET brez hormonske aktivnosti.

Določanje KgA v serumu in po potrebi 5-HIAA v seču sta najpogosteje uporabljene meritvi in ju uporabljamo pred drugimi meritvami kot so: vazoaktivnim intestinalnim peptidom ali provokativnimi testi.

Kaže, da KgA ni le preprost označevalec tumorja, pač pa tudi pospeševalec rast tumorja. Kako učinkuje na rast tumorja, ne vemo. Zdravljenje s somatostatinom je simptomatsko, idealna pa je kirurška odstranitev tumorja (9).

1.7. Metode za določanje kromogranina A

Najbolj uporabljeni metodi za določanje cirkulirajočega KgA sta:

- radioimunski testi in
- encimsko imunski testi.

Radioimnuski test (RIA) je eden najbolj vsestranskih in najobčutljivejših testov za merjenje antigenov in haptanov. Izmerimo lahko izredno majhne količine, zato je metoda primerna za kvantitativno določanje hormonov, serumskih proteinov, zdravil in vitaminov. Pri tem testu uporabljamo radioaktivno zaznamovane (navadno z ^{125}I) antigene, protitelesa in haptan. RIA v tekoči fazi temelji na tekmovanju med zaznamovanim in nezaznamovanim antigenom za omejeno količino močno afinitetnih protiteles. Naraščajoče koncentracije nezaznamovanega antigena izrinejo vse več zaznamovanega antigena z vezišč. Z merjenjem količine prostega zaznamovanega antigena v raztopini lahko določimo koncentracijo nezaznamovanega antigena (4).

Ena izmed najpomembnejših stopenj te metode je ločitev vezanega od nevezanega (prostega) antigena. Razvili so več metod, imenovanih trdne faze RIA, s katerimi je ločevanje kompleksov Ag - Ab od nevezanega antigena lažje. Pri eni od metod se veže protitelo kovalentno na delce saharoze. Količino radioaktivno zaznamovanega antigena, vezanega na delce, lahko kvantitativno izmerimo, ko delce centrifugiramo in speremo. Pri drugem načinu imobiliziramo komplekse na polistiren ali polivinilklorid in izmerimo količino prostega zaznamovanega antigena z gama števcem. Protitelesa lahko imobiliziramo na stene mikrotiterskih jamic. Ta postopek je zelo primeren za merjenje

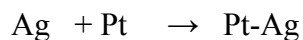
koncentracije določenega antigena v številnih vzorcih in ga veliko uporabljamo kot presejalni test o navzočnosti virusa hepatitisa B. Komplekse lahko ločujemo od prostega antigena tudi z izsoljevanjem, obarjanjem, z denaturacijo ali s polietilen glikolom (PGE), absorpcijo prostega izotopa, gelsko filtracijo, ravnotežno dializo in z elektroforezo (10).

1.7.1. Radioimunski testi

Če želimo izvesti ta test potrebujemo:

- protitelesa proti antigenu, ki ga merimo in
- ta antigen v čisti obliki in radioaktivno zaznamovanega.

Metoda temelji na tekmovanju in sicer med v vzorcu prisotnim markerjem, torej serumskim antigenom in z I^{125} označenim markerjem (označenim antigenom – standard) za količino protiteles. V določenem razmerju se namreč oba antigena vežeta na močno afinitetna receptorska mesta na protitelesih. Ko reakcija poteče določimo koncentracijo označenega vezanega antigena, le-ta pa je obratno sorazmeren koncentraciji določenega serumskega antigena (5).



Legenda:

Ag*- zaznamovani antigen določene koncentracije

Pt – protitelo

Pt-Ag*- zaznamovani kompleks protitelo-antigen

Ag- nezaznamovani antigen standardne ali neznane koncentracije

Pt-Ag –nezaznamovani kompleks protitelo-antigen

1.7.2. Encimsko imunski testi

Ti testi so eden od najbolj specifičnih in občutljivih imunskih tehnik za kvantitativno določanje antigenov.

Za določanje koncentracije KgA v serumu uporabljamo metodo direktnega določanja.

Metodo izvajamo na trdem nosilcu, na plastični mikrotitirni ploščici, na stene katere so s hidrofobnimi interakcijami ali pa kovalentno pritrjena protitelesa proti iskanemu antigenu.

V tem primeru je seveda iskani antigen kromogranin A (7).

Test poteka v več stopnjah:

1. stopnja: vezava specifičnih primarnih protiteles proti antigenu na stene vdolbinic
2. stopnja: imunska reakcija antigena v vzorcu s primarnimi protitelesi
3. stopnja: spiranje neznanega antigena
4. stopnja: inkubacija s sekundarnimi, z encimom označenimi protitelesi. Sekundarno protitelo se mora povezati z epitopom, ki je različen od tistega, s katerim se je povežalo primarno protitelo. Zelo pogosto pri tej metodi uporabljamo kot eno od protiteles poliklonska protitelo, saj ta prepozna različne epitope na enem antigenu in hkrati olajša izbiro drugega monoklonskega protitelesa.
5. stopnja: označeno protitelo se proporcionalno poveže z antigenom, ki je vezan s primarnimi protitelesi
6. stopnja: količino označenih protiteles določimo z dodatkom encimskega substrata, ki se pretvori v obarvan produkt. Absorbanco obarvanega produkta izmerimo s fotometrom. Z umeritveno krivulijo, ki jo izdelamo s standardi znanih koncentracij, lahko določamo koncentracijo preiskovanega antigena (10).

II. NAMEN DELA

Namen te diplomske naloge bo ugotoviti procent povišanih koncentracij kromogranina A pri 486-ih pacientih. Z določitvijo kromogranina A želimo ugotoviti, v kakšnem deležu je le-ta povišan pri karcinoidih.

V analizo bomo vključili 486 serumskih vzorcev in sicer 280-ih žensk in 206-ih moških. Dobljene rezultate bomo obdelali s pomočjo izračunov: aritmetične sredine, standardnega odklona ter mediane. Primerjali bomo procent povišanih vrednosti koncentracije kromogranina A pri moških in pri ženskah posebej, ter poskušali opisati vzroke za te rezultate.

III. EKSPERIMENTALNI DEL

3.1. Uporabljena metoda za določanje kromogranina A v tej diplomski nalogi

3.1.1. Postopek analize za določanje kromogranina A

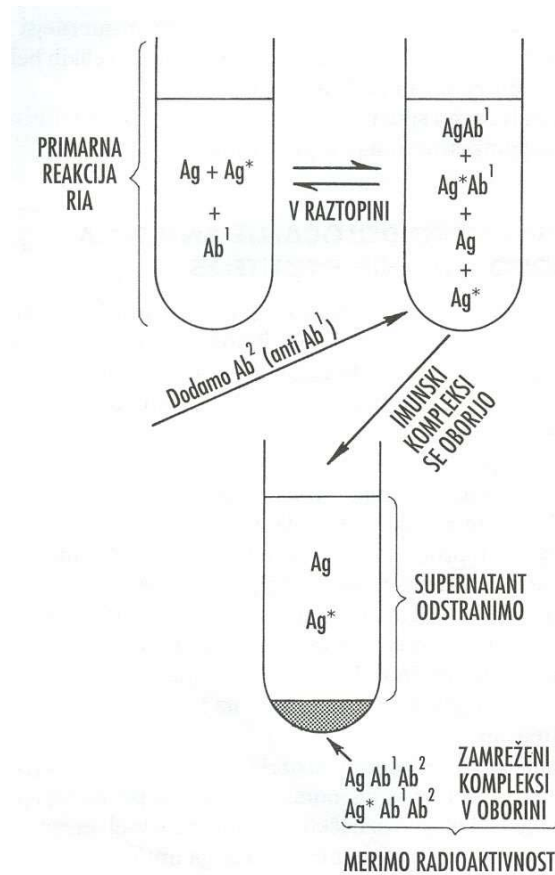
3.1.1.1. Material, ki je potreben za analizo

Precizne pipete, ki so zmožne pipetirati od 50 μ l do 2000 μ l (\pm 1%). Kalibracijo je potrebno vedno preverjati. Destilirana voda. Plastične epruvete za enkratno uporabo. Vrtinčasti in krožni mešalec (11).

3.1.1.2. Radioimunsko določanje antigena z metodo dveh protiteles

S to metodo je bila izvedena analiza, s katero so bili pridobljeni rezultati, ki se sedaj uporabljajo v tej diplomski nalogi.

Za izvedbo te tehnike moramo imeti snov (antigen), ki jo določamo, v kemijsko čisti obliki. Nanjo vežemo radioaktivni označevalec (izotop). Beljakovinske molekule označimo z jodom-125, nebeljakovinske pa ponavadi s tricijem (H^3), prvi je sevalec gama in drugi sevalec beta. Radioaktivnost, ki jo oddajata, merimo v scintilacijskih števcih in jo izrazimo v številkah na minuto (cpm) (10).



Slika 2. shema poteka kompetativnega testa RIA po metodi dveh protiteles

Na sliki 2 je prikazan potek kompetativnega testa RIA po metodi dvojnih protiteles. Test izvedemo v dveh fazah. V klasični izvedbi poteka primarna reakcija v epruveh v raztopini, ki vsebujejo znano količino primarnih protiteles (Ab^1), označeni antigen (Ag^*) in vzorec, v katerem je neznana količina antigena (Ag), ki jo merimo. Reaktanti so v takem razmerju, da je označeni antigen v pribitku glede na razpoložljiva vezišča na protitelesih (4).

Neoznačeni antigen, to je tisti, ki ga želimo izmeriti (Ag), tekmuje z označenim antigenom za vezišča na primarnih protitelesih. Ker je količina označenega antigena v vseh epruveh enaka, je samo od količine neoznačenega antigena v vzorcu odvisno, koliko označenega antigena se bo vezal v imunske komplekse. Označeni imunski kompleksi pa so merljivi izdelek reakcije (11).

V primeru reakcij nastanejo majhni, topni imunski kompleksi. Če želimo izmeriti v komplekse vezano radioaktivnost, moramo najprej določiti preostali prosti označeni

antigen (Ag^*). To naredimo najlažje z dodatkom sekundarnih protiteles (Ab_2), ki prepoznavajo primarna, v kompleks vezana protitelesa (Ab_1) kot svoj antigen.

To je druga faza testa, v kateri nastanejo veliki zamreženi kompleksi, ki vsebujejo vezani Ag . Ti kompleksi precipitirajo, prosti antigen pa ostane v raztopini. S centrifugiranjem ločimo usedlino, odlijemo ali odsesamo supernatant in merimo radioaktivnost, vezano v imunskih kompleksih (10).

Tudi metodo dvojnih protiteles poznamo v različnih izvedbah. Najpogostejša je vezava sekundarnih protiteles na trdne delce, kar olajša ločevanje imunskih kompleksov os prostih antigenov (10).

Koncentracijo antigena, ki ga merimo, določimo iz umeritvene krivulije, ki s svojimi standardnimi pripravki pokriva izbrano koncentracijsko območje. Sestavni del umeritvene krivulije je tudi meritev radioaktivnosti, vezane na tisto količino označenega antigena (Ag^*), ki smo jo na začetku dodali v vsako epruveto (točka celotne radioaktivnosti – CA). To je izhodiščna vrednost za grafični prikaz umeritvene krivulije in je potrebna za izračun vezave označenega antigena s primarnimi protitelesi (Ab_1). Najprimernejša vezava je med 30 in 59 % celotne radioaktivnosti.

Navadno umeritveni krivuliji priključimo še slepi vzorec. Od reaktantov primarne reakcije je pri tem poskusu navzoč samo Ag^* , ostale sestavine pa nadomestimo s pufrom, v katerem poteka reakcija. Slepa je parameter s katero ocenimo nespecifično vezavo Ag^* na stene epruvete v percipitatu. Pri dobro izvedenem testu radioaktivnost SL (slepe) ne sme presegati 5% celotne točke radioaktivnosti (CA).

Pomembna je še določitev S_0 (koncentracija standardnega pripravka = 0), ki ne vsebuje antigena, ampak samo pufer, v katerem antigen topimo (10).

Krivulija pri kompetativnih testih je upadajoča. Vezava Ag^* je največja v točki S_0 in z rastočo koncentracijo Ag v standardnih pripravkih pada.

RIA vedno pripravimo v seriji, saj moramo pri vsakem testu pripraviti umeritveno krivuljijo, smiselno pa je, da ji sledi primerno število vzorcev. Točke umeritvene krivulje in vzorce pripravimo v najmanj dveh ponovitvah, kar pomeni, da po dve epruveti vsebujeta enake sestavine. Koeficient variacije med vrednostmi, izmerjenimi v dvojnikih, ne sme presegati 10% (10).

3.1.1.3. Protokol (postopek, princip)

Vsi reagenti, ki jih uporabljamo morajo biti vsaj 30 minut na sobni temperaturi (18 – 25 °C) pred uporabo. Tudi vnašanje reagentov v epruvete se izvaja na sobni temperaturi.

Test zahteva naslednje vrste epruвет:

- Standardna skupina » 0 » za določitev nespecifičnih vezi,
- Standardne skupine za ugotavljanje standardnih krivulij,
- Kontrolna skupina za kontrolo,
- Sx skupina za test vzorcev seruma ali plazme.

Priporočljivo je, da se test izvede trikrat in to v dvojnih vzorcih. Dosledno je potrebno upoštevati vrstni red dodajanja reagentov:

V vsako epruveto vstavimo 500 µl blažilca, 50µl standardne enote ali vzorca. Nato vsako epruveto nežno premešamo s pomočjo vrtinčastega mešalnika. Tako pripravljene vzorce hranimo 18-20 ur na sobni temperaturi, nato epruvete izperemo. Nato odpipetiramo iz vseh epruвет vso vsebino kolikor se le da natančno in dodamo 1ml čistilne raztopine. Ponovno odpipetiramo vsebino iz vseh epruвет in ponovimo postopek. V epruветah po pranju ne sme ostati nič. Za zanesljive in ponovljive rezultate je potrebno pravilno izvesti različne pralne postopke. Dodajanje pralne raztopine je potrebno izvesti z zadostno hitrostjo, ki v epruветah ustvari turbolenco (11).

Nato v vsako epruveto dodamo 500 µl monoklonskega protitelesa ¹²⁵I anti CGA, vključno s tremi delovnimi epruветami. Pripravljene epruvete hranimo 2uri ± 5 minut na sobni temperaturi in mešamo. Nato epruvete izperemo kot je opisano zgoraj in na koncu izmerimo radioaktivnost, ki se nahaja v epruветah s pomočjo merilca gama radiacije (11).

3.1.1.4. Reagenti

Uporabljeni so reagenti od proizvajalca Calimat. Datum uporabe je označen na embalaži. Kot sredstvo za izpiranje se uporabijo tablete istega proizvajalca.

Epruvete za enkratno uporabo: Pripravljene za uporabo. Anti CGA monoklono protitelesce se nahaja na dnu epruvete. Shranjevanje; 2-8 °C do roka uporabe. Neuporabljene epruvete izven zavočka je potrebno hraniti v plastični vrečki, ki se nahaja v opremi.

Anti CGA ¹²⁵I: Pripravljen na uporabo. ¹²⁵I anti CGA monoklonskih protiteles, blažilec, serum, natrijev acetat, rdeče barvilo, neimunizirani mišji imunoglobolini, EDTA. Shranjevanje; 2-8 °C do roka uporabe.

Standardi: Serumska koncentracija kromogranina A (CGA), človeški serum, EDTA, konzervans: 50-125-300-600-1200 (standardni vzorec Calimat) µg/L raztopine v 0,5 ml destilirane vode. Shranjevanje; 2-8 °C do roka uporabe. Po raztapljanju je rok trajanja ena ura na sobni temperaturi. Hraniti zamrznjeno v stekleničkah pri -20° C za obdobje šestih tednov.

Kontrola: Serumska koncentracija kromogranina A, človeški serum, konzervans. 180 ng/ml (kontrolnega vzorca Calimat) raztopite v 0,5ml destilirane vode. Shranjevanje; 2-8 °C do roka uporabe. Po raztapljanju je rok trajanja ena ura na sobni temperaturi. Hranjeno zamrznjeno pri -20 °C za obdobje šestih tednov.

Blažilec (puffer): Pripravljen na uporabo. Uporabljen kot blažilec pri redčenju, rdečilo pri standardu 0. Blažilec, natrijev acetat, EDTA. Shranjevanje; 2-8 °C do roka uporabe.

Sredstvo za izpiranje: 5 tabletk proizvajalca Calimat, za določanje humanega kromogranina A. Raztopite v 500 ml destilirane vode, nežno pretresite. Shranjevanje; 2-8 °C, po raztopitvi hranite v pokriti posodi največ 15 dni (11).

3.1.1.5. Ocena kvalitete rezultatov

Za oceno kvalitete potrebujemo validirano metodo. V tej diplomski nalogi je metoda le delno validirana, ker so uporabljeni rezultati validacije, ki so bili opravljeni junija leta 2005 v Franciji. Zaradi dela z nevarnimi snovmi (rokovanja z izotopom) pri določanju kromogranina A, nisem sama delala metode, ker je za to potrebno posebno dovoljenje z strani inšpektorja za delo. Zato so ta del postopka opravili tehniki, ki tako dovoljenje imajo.

Postopek vrednotenja poteka:

1. priprava protokola vrednotenja kandidatne metode
2. priprava obrazcev za zbiranje rezultatov vrednotenja
3. ugotovitev območja dela metode
4. ugotovitev natančnosti metode
5. ugotovitev analitične občutljivosti metode
6. ugotovitev meje zaznave
7. ter ugotovitev analitične specifičnosti metode
8. na koncu določimo še referentni interval in ugotovimo stabilnost reagentov.

Cilj vsake analize je končni rezultat, ki pove, koliko določene sestavine je v preiskovanem vzorcu. Da lahko govorimo o pravih rezultatih je potrebno določiti ponavljivost in pravilnost metode s katero smo določali dobljene rezultate (12).

Ponavljivost rezultatov nam govori o natančnosti metode. Razlikujemo ponavljivost rezultatov v seriji, med serijami in ponavljivost iz dneva v dan, slednja daje najbolj realno sliko o natančnosti metode. Merilo za natančnost metode je koeficient variacije (KV, CV).

Enačba za izračun koeficienta variacije: $KV = SD/Xp * 100$

Standardno deviacijo delimo z aritmetično sredino in pomnožimo s 100

Izračunamo še aritmetično sredino (Xp) in standardno deviacio (SD).

Enačba za izračun aritmetične sredine: $Xp = \sum Xi/N$

Vsoto vseh meritev delimo s številom N.

Enačba za izračun standardne deviacije: $SD = \sqrt{\sum(X_i - X_p)^2 / (N-1)}$

Od vsote vseh meritev odštejemo aritmetično sredino in kvadriramo. Nato delimo z N-1.

Enačba je v celoti pod korenem.

Točnost oziroma pravilnost metode je določena z odklonom (Bias) izmerjene vrednosti rezultata od prave vrednosti oziroma z napako. Poznamo absolutno in relativno napako ter sistemske in naključne napake. Napake lahko določamo grafično (naklon korelacijske premice) ali računsko (13).

Enačba za izračun relativne napake: $RE = (C_{izm} - C_{pr}) / C_{pr} * 100$

Od izmerjene koncentracije odštejemo pravo vrednost koncentracije, ki je podana, ter delimo s to pravo vrednostjo, ki je podana in pomnožimo z 100.

Najboljše merilo za točnost je celokupna napaka (TE). To moramo določiti za vsako klinično pomembno območje koncentracij posebej. Totalna napaka je sistematična plus naključna napaka. Sistemska napaka je lahko samo enosmerna. Konstantna je (vedno enaka neglede na koncentracijo analita); običajno zaradi interferenc. Proporcionalna (se večja sorazmerno s koncentracijo analita); na primer zaradi napake v standardih (13).

Enačba za izračun absolutne napake: $AE = C_{izm} - C_{pr}$

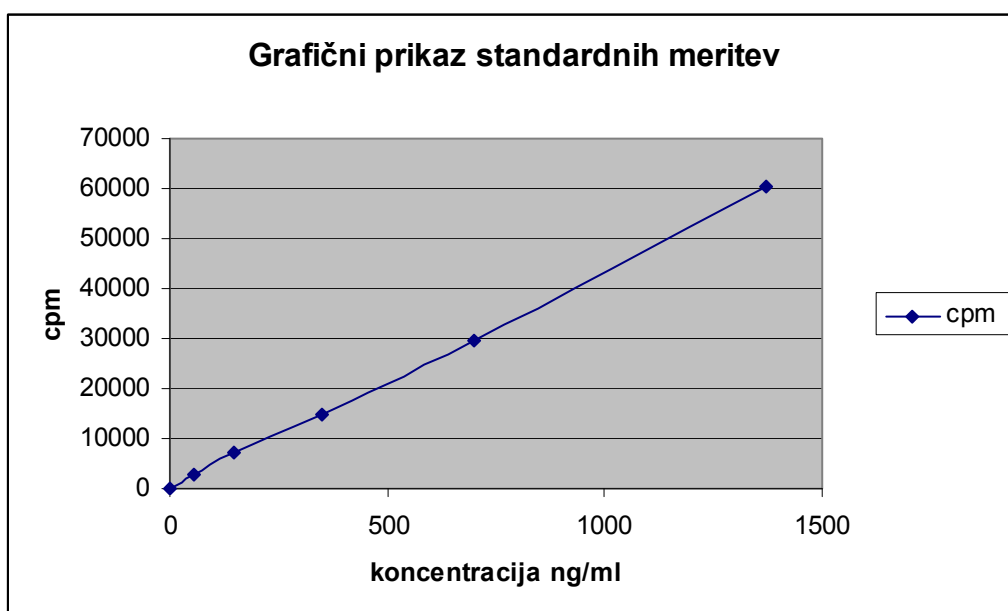
Je razlika med izmerjeno koncentracijo in podano oziroma sprejeto vrednostjo.

Rezultati, ki jih ne smemo zamenjati z laboratorijskimi, nam prikazujejo, da je metoda, s katero je bila določena koncentracija kromogranina A v tej diplomski nalogi, točna in natančna:

Tabela 2: Prikazuje koncentracijo standardnih meritev, za validacijo metode uporabljene v tej diplomski nalogi.

Skupina epruвет	cpm	Koncentracija v $\mu\text{g/L}$
Standard 0	55	0

Standard 1	2954	55
Standard 2	7110	145
Standard 3	14878	350
Standard 4	29522	700
Standard 5	60248	1370
Kontrola	7288	165



Graf 1: Grafičen prikaz tabele 2

3.1.1.5.1. Omejitev postopka

Vzorci, ki kažejo znake motnosti, hemolize, hiperlipemije ali vsebujejo fibrin lahko dajo napačne rezultate. Vrednosti vzorcev ne smemo zamenjati z vrednostmi standardnih meritev. Če pride do omejenih vzorcev, jih še enkrat raztopimo in ponovimo test (11).

3.1.1.5.2. Pričakovane vrednosti

Vsak laboratorij si mora vzpostaviti svoj lasten razpon normalnih vrednosti, glede na tip vzorca, ki je trenutno v testiranju. CGA je protein, ki se veže s kalcijem, torej na meritev vpliva koncentracija Ca^{2+} . Normalne vrednosti se razlikujejo glede na to, ali se uporablja serum ali plazma. Spodnja tabela vsebuje primer vrednosti seruma pridobljenega pri populaciji 162 domnevno zdravih posameznikov. 95% vrednosti populacije je med 19,4 in 98,1 $\mu\text{g/L}$ srednja vrednost je 41,6 $\mu\text{g/L}$. Pri uporabi plazme je prav tako priporočljivo, da se izmeri normalna vrednost plazme (11).

Natančnost metode, s katero so pridobljeni rezultati, ki so uporabljeni v tej diplomski nalogi, smo pridobil tako, da smo tri vzorce z različnimi koncentracijami testirali petnajstkrat v isti seriji in dvakrat v dvajsetih različnih serijah;

Razpredelnica 2. Prikaz testiranja treh vzorcev, za pridobitev natančnosti metode

Vzorec	$\mu\text{g/L}$	V seriji CV%	Med serijo CV%
1	29.9	6.0	8.5
2	144	3.8	5.7
3	996	2.2	5.3

Recovery test (test obnovitve) nam pokaže točnost metode. V človeški serum so bile dodane znane količine CGA. Odstotek obnovitve človeške CGA v vzorcih se je gibal od 90 do 110%. Podatki so pridobljeni iz Modela 10, ki je bil validiran junija leta 2005 v Franciji (4).

Analitična specifičnost je lastnost metode, da v zmesi kemijsko podobnih snovi izmerimo le koncentracijo analita, ki ga določamo. Imamo dva monoklonska protitelesa, ki omogočata celotno in fragmentarno cirkulacijo testiranega kromogranina A. (10)

Pri meji zaznave (detekcija LOD) izhajamo iz tega, da jr pri neki zelo nizki koncentraciji analita signal kljub vsemu statistično značilno večji od »šuma« (signal slepega vzorca).

Določimo jo tako, da trideset krat izmerimo signal slepega vzorca ter izračunamo povprečje in standardno deviacijo teh meritev.

Mejo detekcije nato izračunamo po enačbi: $LOD = Asl + k * SDsl$

$k = 2$ ali 3

Pri $k = 2$ zajamemo 95,45% vseh meritev, pri $k = 3$ pa 99,73% meritev. Metoda je dobra, če ima čim višjo občutljivost in čim nižjo mejo detekcije (4).

Dobljena vrednost pri moji metodi se ocenjuje na 1,5ng/ml in je prav tako pridobljena iz Modela 10, ki je bil validiran junija leta 2005 v Franciji.

IV. REZULTATI

Tabela 3.: Tabela nam prikazuje koncentracijo kromogranina A in je razdeljena glede na spol.

Št.	Spol	S-kromogranin
1	M	101,3
2	M	33,6
3	M	105,1
4	M	36,7
5	M	279,4
6	M	855,2
7	M	67,8
8	M	56,4
9	M	290,5
10	M	663,0
11	M	100,4
12	M	20,8
13	M	38,9
14	M	36,9
15	M	64,4
16	M	420,2
17	M	2130,5
18	M	57,0
19	M	205,0
20	M	34,8
21	M	67,4
22	M	257,7
23	M	70,4
24	M	50,2
25	M	481,6
26	M	43,2
27	M	38,5
28	M	71,8
29	M	43,5
30	M	76,8
31	M	46,4
32	M	452,1

Št.	Spol	S-kromogranin
33	M	52,0
34	M	51,7
35	M	105,8
36	M	146,0
37	M	41,4
38	M	53,5
39	M	1672,0
40	M	368,1
41	M	91,0
42	M	1779,2
43	M	67,6
44	M	68,9
45	M	664,3
46	M	38,3
47	M	153,2
48	M	253,4
49	M	89,9
50	M	104,0
51	M	242,0
52	M	447,9
53	M	31,7
54	M	85,8
55	M	63,9
56	M	172,2
57	M	58,8
58	M	99,0
59	M	161,8
60	M	108,5
61	M	102,5
62	M	26,5
63	M	124,3
64	M	149,4

Št.	Spol	S-kromogranin
65	M	232,3
66	M	43,1
67	M	52,1
68	M	42,6
69	M	68,3
70	M	110,5
71	M	241,8
72	M	98,7
73	M	115,2
74	M	200,0
75	M	115,7
76	M	87,2
77	M	125,9
78	M	899,7
79	M	81,3
80	M	43,2
81	M	59,5
82	M	109,4
83	M	123,9
84	M	44,9
85	M	48,3
86	M	99,7
87	M	57,1
88	M	87,6
89	M	277,3
90	M	88,6
91	M	212,0
92	M	51,2
93	M	0,0
94	M	63,0
95	M	388,8
96	M	73,0
97	M	122,0
98	M	35,7
99	M	71,2
100	M	129,6
101	M	365,0
102	M	198,5
103	M	58,9
104	M	35,7
105	M	857,8
106	M	54,8
107	M	43,3
108	M	51,1
109	M	406,1
110	M	87,4
111	M	44,5
112	M	52,0

Št.	Spol	S-kromogranin
113	M	31,2
114	M	621,9
115	M	84,7
116	M	49,3
117	M	251,0
118	M	755,0
119	M	36,5
120	M	62,1
121	M	280,0
122	M	87,1
123	M	84,4
124	M	661,3
125	M	631,8
126	M	216,5
127	M	66,1
128	M	33,0
129	M	44,2
130	M	131,1
131	M	27,3
132	M	206,6
133	M	63,3
134	M	46,8
135	M	24,0
136	M	54,1
137	M	460,9
138	M	79,2
139	M	599,5
140	M	1891,4
141	M	125,6
142	M	44,4
143	M	63,6
144	M	311,4
145	M	41,2
146	M	45,1
147	M	54,7
148	M	66,9
149	M	26,3
150	M	28,4
151	M	118,3
152	M	58,1
153	M	1284,1
154	M	38,1
155	M	312,6
156	M	70,6
157	M	287,7
158	M	62,3
159	M	84,7
160	M	54,3

Št.	Spol	S-kromogranin
161	M	130,4
162	M	98,1
163	M	29,8
164	M	338,2
165	M	531,2
166	M	63,1
167	M	397,5
168	M	72,4
169	M	90,7
170	M	66,6
171	M	49,2
172	M	21,9
173	M	59,5
174	M	38,8
175	M	230,5
176	M	90,0
177	M	74,5
178	M	217,0
179	M	51,3
180	M	75,3
181	M	299,7
182	M	100,4
183	M	233,5
184	M	38,6
185	M	42,5
186	M	148,1
187	M	108,2
188	M	49,4
189	M	34,5
190	M	58,4
191	M	54,8
192	M	77,5
193	M	81,2
194	M	288,6
195	M	1453,7
196	M	393,9
197	M	34,2
198	M	63,9
199	M	36,8
200	M	52,0
201	M	31,5
202	M	324,0
203	M	112,8
204	M	50,6
205	M	114,8
206	M	60,0

Št.	Spol	S-kromogranin
1	Ž	60,0
2	Ž	138,1
3	Ž	21,2
4	Ž	42,6
5	Ž	74,2
6	Ž	1859,4
7	Ž	102,9
8	Ž	107,7
9	Ž	91,9
10	Ž	54,9
11	Ž	269,8
12	Ž	148,8
13	Ž	51,1
14	Ž	103,7
15	Ž	368,6
16	Ž	72,7
17	Ž	44,6
18	Ž	462,9
19	Ž	30,9
20	Ž	53,8
21	Ž	45,9
22	Ž	39,0
23	Ž	151,5
24	Ž	2064,6
25	Ž	65,5
26	Ž	39,7
27	Ž	412,0
28	Ž	47,7
29	Ž	53,0
30	Ž	774,2
31	Ž	583,8
32	Ž	108,5
33	Ž	15,2
34	Ž	1552,8
35	Ž	68,9
36	Ž	40,1
37	Ž	35,8
38	Ž	42,2
39	Ž	115,0
40	Ž	41,6
41	Ž	104,2
42	Ž	53,3
43	Ž	24,0
44	Ž	84,1
45	Ž	175,7
46	Ž	68,7
47	Ž	419,0
48	Ž	33,5
49	Ž	109,3

Št.	Spol	S-kromogranin
50	Ž	192,0
51	Ž	60,2
52	Ž	124,8
53	Ž	243,4
54	Ž	797,1
55	Ž	498,2
56	Ž	177,5
57	Ž	66,1
58	Ž	32,3
59	Ž	48,2
60	Ž	38,3
61	Ž	28,1
62	Ž	528,9
63	Ž	54,1
64	Ž	87,1
65	Ž	43,5
66	Ž	74,6
67	Ž	43,9
68	Ž	55,4
69	Ž	31,0
70	Ž	83,3
71	Ž	67,4
72	Ž	47,4
73	Ž	93,4
74	Ž	64,2
75	Ž	113,1
76	Ž	108,2
77	Ž	75,4
78	Ž	41,5
79	Ž	2316,8
80	Ž	232,1
81	Ž	295,1
82	Ž	20,7
83	Ž	50,3
84	Ž	37,9
85	Ž	76,1
86	Ž	91,3
87	Ž	663,0
88	Ž	92,1
89	Ž	65,0
90	Ž	115,4
91	Ž	89,7
92	Ž	57,3
93	Ž	88,4
94	Ž	243,7
95	Ž	57,1
96	Ž	26,8
97	Ž	352,9
98	Ž	72,5

Št.	Spol	S-kromogranin
99	Ž	88,5
100	Ž	56,9
101	Ž	59,7
102	Ž	442,5
103	Ž	418,2
104	Ž	162,9
105	Ž	56,0
106	Ž	31,0
107	Ž	45,9
108	Ž	155,7
109	Ž	360,5
110	Ž	629,1
111	Ž	142,8
112	Ž	67,0
113	Ž	44,3
114	Ž	53,1
115	Ž	33,4
116	Ž	1818,7
117	Ž	46,1
118	Ž	694,3
119	Ž	148,6
120	Ž	18,0
121	Ž	71,9
122	Ž	47,2
123	Ž	160,0
124	Ž	79,7
125	Ž	52,7
126	Ž	61,0
127	Ž	152,4
128	Ž	52,3
129	Ž	45,6
130	Ž	315,1
131	Ž	1399,4
132	Ž	2206,3
133	Ž	2152,5
134	Ž	1940,1
135	Ž	124,3
136	Ž	317,0
137	Ž	587,9
138	Ž	31,9
139	Ž	492,1
140	Ž	78,6
141	Ž	41,5
142	Ž	106,0
143	Ž	114,7
144	Ž	61,9
145	Ž	338,2

Št.	Spol	S-kromogranin
148	Ž	72,0
149	Ž	105,5
150	Ž	23,8
151	Ž	27,8
152	Ž	29,9
153	Ž	880,5
154	Ž	192,8
155	Ž	121,5
156	Ž	66,3
157	Ž	69,0
158	Ž	69,1
159	Ž	65,2
160	Ž	109,7
161	Ž	72,0
162	Ž	54,4
163	Ž	256,0
164	Ž	639,6
165	Ž	124,8
166	Ž	66,5
167	Ž	19,7
168	Ž	223,6
169	Ž	26,9
170	Ž	104,7
171	Ž	144,0
172	Ž	34,1
173	Ž	26,7
174	Ž	24,0
175	Ž	165,0
176	Ž	205,8
177	Ž	171,9
178	Ž	43,7
179	Ž	123,4
180	Ž	42,5
181	Ž	49,4
182	Ž	129,0
183	Ž	31,1
184	Ž	75,5
185	Ž	32,0
186	Ž	111,7
187	Ž	843,1
188	Ž	84,5
189	Ž	55,2
190	Ž	58,7
191	Ž	95,9
192	Ž	111,0
193	Ž	175,6
194	Ž	32,8

146	Ž	57,9
147	Ž	43,0
Št.	Spol	S-kromogranin
197	Ž	90,0
198	Ž	440,1
199	Ž	38,1
200	Ž	98,2
201	Ž	12,5
202	Ž	132,5
203	Ž	145,7
204	Ž	186,2
205	Ž	71,6
206	Ž	76,0
207	Ž	91,2
208	Ž	37,4
209	Ž	384,6
210	Ž	361,5
211	Ž	61,9
212	Ž	33,0
213	Ž	48,3
214	Ž	45,4
215	Ž	241,9
216	Ž	22,8
217	Ž	24,7
218	Ž	34,1
219	Ž	42,3
220	Ž	91,2
221	Ž	161,2
222	Ž	81,9
223	Ž	136,8
224	Ž	80,2
225	Ž	147,8
226	Ž	49,6
227	Ž	28,6
228	Ž	40,3
229	Ž	35,2
230	Ž	23,6
231	Ž	82,2
232	Ž	51,4
233	Ž	102,4
234	Ž	29,8
235	Ž	75,4
236	Ž	69,4
237	Ž	41,2
238	Ž	281,4

195	Ž	157,7
196	Ž	177,1
Št.	Spol	S-kromogranin
239	Ž	91,4
240	Ž	33,3
241	Ž	45,3
242	Ž	49,6
243	Ž	38,9
244	Ž	51,7
245	Ž	19,5
246	Ž	42,7
247	Ž	41,9
248	Ž	540,3
249	Ž	32,4
250	Ž	722,2
251	Ž	383,0
252	Ž	41,0
253	Ž	91,7
254	Ž	136,8
255	Ž	273,1
256	Ž	31,0
257	Ž	147,9
258	Ž	1533,0
259	Ž	126,3
260	Ž	58,1
261	Ž	232,3
262	Ž	143,2
263	Ž	42,3
264	Ž	50,6
265	Ž	256,8
266	Ž	49,4
267	Ž	60,7
268	Ž	113,2
269	Ž	42,1
270	Ž	47,7
271	Ž	132,5
272	Ž	178,5
273	Ž	41,3
274	Ž	48,3
275	Ž	54,9
276	Ž	1387,8
277	Ž	131,0
278	Ž	80,5
279	Ž	34,8
280	Ž	25,9

Iz zgornjih tabel sem najprej izračunala za vsak spol posebej aritmetično sredino, ki znaša za ženske 199,40 za moške pa 192,99. Naslednji korak je bil izračun standardnega odmika prav tako za oba spola in na koncu še mediana. Nato sem izračunala odstotek pacientov, ki imajo povišane vrednosti serumske koncentracije kromogranina A in jih primerjala med sabo. In sicer, pri ženskah gre za 31,43 % povišanih vrednosti pri moških pa ta odstotek znaša 29,61 %. Iz tega razberemo, da je pri ženskah večji odstotek povečanih vrednosti, kot pri moških, a moramo upoštevati, da je ženskih vzorcev 280, moških pa 206.

Za ugotovitev povišanih vrednosti koncentracije kromogranina A, sem se orientirala na referenčne vrednosti, ki znašajo za oba spola $90 \mu\text{g/L} \pm 24 \mu\text{g/L}$. To pomeni, da vse koncentracije kromogranina A, ki so nad $114 \mu\text{g/L}$ smatramo za povišane vrednosti. Vzroki, za takšna stanja še niso pojasnjeni, zato moramo biti pozorni pri interpretaciji teh rezultatov, saj lahko povzročijo takšne rezultate lažni vzroki, primer so bolniki z okvaro ledvic ali jeter.

V. REZPRAVA

V diplomski nalogi so uporabljeni podatki, ki so bili pridobljeni s strani mentorja. Metoda, ki je bila uporabljena za določanje koncentracije kromogranina A je bila validirana junija leta 2005 v Franciji.

Za rezultate, ki so uporabljeni pri izračunih in nato naprej pri diskusiji lahko rečem, da so zanesljivi, saj je bil pri validaciji opravljen recovery test. Odstotek obnovitve se je gibal med 90 in 110 %, kar kaže na točnost metode. Da pa je metoda dovolj natančna in dovolj občutljiva, pa je razvidno iz ponovljivost rezultatov, ki nam povedo o natančnosti metode.

V nalogi, je bilo testiranih 486 vzorcev, od tega 28 ženskih vzorcev in 206 moških vzorcev. Pri opravljanju izračunov sem prišla do zaključka, da je 31,43 odstotkov pacientk, ki imajo povišane vrednosti koncentracije kromogranina A v serumu in 29,61 odstotkov moških. Do takšnih podatkov sem prišla s pomočjo referenčnih vrednosti, ki se seveda od avtorja do avtorja razlikujejo, saj je področje kromogranina A še precej neraziskano. Uporabljene so bile referenčne vrednosti avtorja Noblesa in sicer znašajo za oba spola $90 \pm 24 \mu\text{g/L}$.

Vzroki za povišane vrednosti še niso pojasnjeni, pozorni pa moramo biti na spol, glede na to ali imamo opravka z bolniki, ki imajo okvaro ledvic, jeter, atrofičen gastritis, saj lahko dobimo lažno zvišane vrednosti. To pa zato ker prihaja tudi do spontanega sproščanja kromogranina A iz sredice nadledvičnih žlez in vzrok za njih še ni pojasnjen.

Na vprašanje, kaj zvišuje koncentracijo serumskega kromogranina A, tudi če ni nevroendokrinega tumorja ali neke druge bolezni, je dal delni odgovor poskus; selektivno so dražili različne endokrine žleze, koncentracija serumskega kromogranina A pa se je zvečala le pri draženju nadledvične žleze. Iz tega lahko rečemo, da na povišane vrednosti kromogranina A v serumu vpliva stopnja razdraženosti nadledvičnih žlez.

Kot sem že omenila, je metoda le delno validirana, zato zaradi nepopolnosti podatkov o času zdravljenja oziroma terapiji in stopnji bolezni ne moramo izračunati diagnostične

specifičnosti in natančnosti. Torej teh podatkov ne moramo uporabiti za postavitve diagnoze.

Lahko pa rečem, da je z določitvijo kromogranina A zelo dobro prikazano stanje poteka bolezni. To pa lahko zaključimo iz večkratnih odvzemov pri istem pacientu in sicer v različnih stadijih obolenja, kar pa v primeru tej diplomske naloge žal tudi ne moramo reči, ker nimamo teh podatkov zaradi preobširnosti diplomske naloge.

Iz vsega povedanega lahko sklepamo, da na povišane vrednosti koncentracije kromogranina A v serumu vplivajo tako spol, kot starost. Odvisno je tudi od tega za katere vrste bolnikov je bil opravljen test, saj pri bolnikih z okvarami jeter in ledvic lahko zasledimo napačen oziroma lažen porast koncentracije kromogranina A v serumu. Možni so seveda lahko še drugi vzroki, ki pa jih jaz žal nisem ugotovila, ker morajo biti izdana posebna dovoljenja s strani inšpektorja za delo, kadar se rokujemo z izotopom in, ker je žal področje še precej neraziskano.

VI. SKLEP

Poznavanje kromogranina A se je v zadnjem desetletju zelo povečalo. KgA je tako indikator simpatoadrenalne aktivnosti kot označevalec neuroendokrinih novotvorb. Poznamo strukturne posebnosti molekule KgA, urejevanje njegove biosinteze in izločanja in vpliv na sekretorno aktivnost neuroendokrinih celic. Diagnostična meritev KgA pri neuroendokrinih tumorjih ima veliko vrednost.

V diplomski nalogi sem poskušala ugotoviti procent povišanih vrednosti v podanih vzorcih in vzroke za takšna stanja. Zaradi delno validirane metode in nepopolnih, ter preobsežnih podatkov za to diplomsko nalogo sem prišla do zaključka, da na povišane vrednosti kromogranina A vplivajo tako starost kot spol, čas odvzema vzorca, v katerem stadiju bolezni je bil odvzet vzorec, za katere vrste bolnikov gre. Možni so seveda še drugi vzroki, ki pa jih jaz nisem morala predstaviti zaradi že omenjenih težav.

VII. VIRI IN LITERATURA

1. Robert B., M.D. (2002). Veliki zdravstveni priročnik. Ljubljana: Založba Mladinske knjige, 15. del, str. 789 - 797
2. Mašera. (1999/200). Predavanja iz predmeta patologije s histološkimi tehnikami
3. Boerisch T., (1989). Immunohistochemical staining methods, Ed: DARKO, California USA, str. 18 - 25
4. Joško O., (2008). Izbrana poglavja iz kljinične kemije. Ljubljana: Narodna in univerzitetna knjižnica, IV. poglavje, str. 93 - 103
5. Vozelj M., (200). Temelji imunologije. Ljubljana: DZS
6. <http://vestnik.szd.si/st3-9/507-523.pdf>
7. Luca C. (2007). Chromogranin A a circulating neuroendocrine marker. Revija št.15, str. 12 -15
8. Blaschko H, Comaline RS, Schneider PH, Silver M, Smith AD. (1967). Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation.
9. Pavlin R., (2003). Kromogranin in njegova klinična uporabnost. Zdravstveni vestnik št. 72, str. 507-513
10. Kotnik V., (2001). Imunologija priročnik za vaje. Ljubljana: Copyright Medicinski razgledi, str. 27-30
11. <http://www.ibl-america.com/pdf>
12. Nataša G., (1998). Analizna kemija eksperimentalni del. Ljubljana: Mladinska knjiga, st. 92-104
13. Janja M., (2001). Navodila in dnevnik za vaje iz klinične biokemije. Ljubljana, str.31-34