

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANITA BAVDEK

**KLINIČNI POMEN DOLOČANJA TIMIDIN KINAZE PRI  
KRONIČNO LIMFATIČNI LEVKEMIJI  
CLINICAL SIGNIFICANCE OF DETERMING THYMIDINE  
KINASE IN CHRONIC LYMPHATIC LEUKEMIA**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Praktično delo za diplomsko nalogo sem opravljala na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Kliničnega centra Ljubljana pod mentorstvom prof.dr. Joška Osredkarja, mag. farm. spec. med. biokem., in somentorstvom prof.dr. Petra Černelča, dr.med.

### **Zahvala**

Zahvaljujem vse vsem delavcem v laboratoriju na Kliničnem oddelku za hematologijo na Polikliniki v Ljubljani, ki so mi pomagali pri praktičnem delu v laboratoriju. Posebna zahvala prof. dr. Jošku Osredkarju in prof. dr. Petru Černelču dr. med., ki sta mi omogočila izvedbo diplomske naloge in me odlično usmerjala skozi njeno nastajanje.

Ne smem pozabiti tudi na vse svoje bližnje, ki sem jim hvaležna za podporo in razumevanje.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom dr. Joška Osredkarja in somentorstvom prof.dr. Petra Černelča dr. med.

## KAZALO VSEBINE

<b>POVZETEK</b> .....	<b>iv</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>v</b>
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.2 <i>KRONIČNA LIMFATIČNA LEVKEMIJA</i> .....	4
1.2.1 Diagnostični postopki .....	5
1.3 <i>TUMORSKI OZNAČEVALCI</i> .....	9
1.3.1 Določanje tumorskih označevalcev v serumu .....	10
1.3.2 Senzitivnost in specifičnost tumorskih označevalcev .....	11
1.3.4. Pomanjkljivosti tumorskih označevalcev .....	13
1.3.5 Razdelitev tumorskih označevalcev .....	13
LAKTAT DEHIDROGENAZA (LDH) .....	15
BETA-2-MIKROGLOBULIN .....	17
TIMIDIN KINAZA .....	18
<b>2. NAMEN DELA</b> .....	<b>20</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEL</b> .....	<b>21</b>
3.1 <i>TIMIDIN KINAZA</i> .....	21
3.1.1 Princip metode .....	21
3.1.2 Materiali .....	22
3.1.3. Postopek testa.....	22
3.1.4. Kalibracija aparature .....	23
3.1.5 Opis metode .....	23
3.1.6 Kontrola kakovosti.....	23
3.2 <i>β 2-MIKROGLOBULIN</i> .....	24
3.2.1 Princip metode .....	24
3.2.2 Materiali .....	25
3.2.3 Princip testa.....	25
3.2.4 Opis metode .....	25
3.2.5 Kalibracija aparature .....	26
3.2.6 Kontrola kakovosti.....	26
3.3 <i>LAKTAT DEHIDROGENAZA (LDH)</i> .....	27

3.3.1 Princip metode .....	27
3.3.2 Reagenti .....	27
3.3.3 Opis metode .....	27
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>29</b>
4.1 VZORCI .....	29
4.2 PREGLEDNICE IZMERJENIH KONCENTRACIJ VZORCEV .....	30
4.2. REMISIJA .....	32
4.2.1. Rezultati določanja koncentracije timidin kinaze .....	32
4.2.2 Rezultati določanja koncentracije $\beta$ -2 mikroglobulina .....	33
4.2.3. Rezultati določanja LDH .....	33
4.3 RELAPS .....	34
4.3.1. Rezultati določanja koncentracije timidin kinaze .....	34
4.3.2. Rezultati določanja koncentracije $\beta$ -2 mikroglobulina .....	34
4.3.3. Rezultati določanja LDH .....	35
4.3. IZRAČUNI KORELACIJ.....	39
4.3.1 Remisija .....	39
4.3.2 Relaps .....	42
<b>5. RAZPRAVA.....</b>	<b>45</b>
<b>6. SKLEP .....</b>	<b>48</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>49</b>

## **POVZETEK**

Kronična limfatična levkemija je vrsta krvnega raka, katera glavna značilnost je nenadzorovana razrast spremenjenih rakavih celic. Incidenca levkemije brez znanega razloga skokovito narašča. Za njim obolevajo vse starostne skupine, čeprav se pogostnost sorazmerno viša s starostjo.

Z našo diplomsko nalogo smo želeli ugotoviti klinični pomen določanja nekaterih tumorskih označevalcev. Tumorski označevalci ali markerji so snovi, ki jih izločajo rakaste celice. Na tak način lahko določimo bodisi začetek bolezni, spremljamo potek zdravljenja ali pa ugotovimo ponovni zagon bolezni.

V našem primeru smo merili koncentracijo timidin kinaze, laktat dehidrogenaze in beta-2 mikroglobulina. Ugotovili smo povišane koncentracije timidin kinaze pri 68% bolnikov in povišano koncentracijo B2MG pri 52 % bolnikov, ter povišano koncentracijo LDH pri 2,6% bolnikov.

Na podlagi dobljenih rezultatov in z izračuni korelacij smo ugotovili, da si serumske koncentracije tumorskih označevalcev, ki smo jih analizirali med seboj niso povezane. To ugotovitev lahko pripisujemo temu, da bolnike nismo obravnavali pred zdravljenjem in da smo imeli premajhno število preiskovancev. Pri vrednotenju rezultatov moramo upoštevati še druge dejavnike, ki vplivajo na koncentracije tumorskih označevalcev.

## SEZNAM OKRAJŠAV

Okrajšava	Pomen
KLL:	kronična limfatična levkemija
TK	timidin kinaza
B2MG	beta - 2 - mikroglobulin
LDH	laktat dehidrogenaza
NHL	Ne-Hodkinov limfom
HL	Hodkinov limfom
DNK	deoksiribonukleinska kislina
ATP	adenozin trifosfat
NK	naravna celica ubijalka
HLA	poglavitni histokompatibilnostni kompleks

## 1.UVOD

Maligni limfomi ali, kot jih pogosto imenujemo ne-Hodkinovi limfomi so heterogena skupina novotvorb, ki nastanejo zaradi nenadzorovanega razraščanja celic limfatičnega tkiva. So klonske bolezni, ki nastanejo z maligno preobrazbo ene celice limfatične vrste B, T ali NK (2).

Levkemije so redke rakaste novotvorbe krvotvornega tkiva, katerih značilnost je kopičenje enega klona nenormalnih in posledično nefunkcionalnih krvnih celic v kostnem mozgu in v krvi. Ker celice ne podležejo apoptozi, se kopičijo v kostnem mozgu, zaradi česar se pojavi slabokrvnost, nevtropenija in trombocitopenija. Glede na vrsto celic jih delimo v limfatične in mieloične, glede na razvojno stopnjo levkemičnih celic in potek bolezni pa v akutne (hitro potekajoče) in kronične (dolgotrajne) (15, 8).

Poznamo štiri najpogostejše kronične levkemije: kronično mieloično levkemijo, ki spada med mieloproliferativne bolezni ter kronično limfocitno levkemijo, dlakastocelično levkemijo in prolimfocitno levkemijo, ki spadajo med limfoproliferativne bolezni (3).

Limfoproliferativne bolezni so rakaste novotvorbe, ki nastanejo zaradi nenadzorovanega razraščanja celic limfatičnega tkiva. Nastanejo z maligno preobrazbo ene celice limfatične vrste B, T ali NK. Lastnosti te celice se prenašajo na potomke. Maligno celico primerjamo glede na morfološke in imunološke značilnosti celične membrane in citoplazme posamezno stopnjo v normalnem razvoju celic limfocitne vrste in jo po njej poimenujemo. Maligne limfome najpogosteje prizadenejo bezgavke, vranico, nebni in kostni mozeg, zaradi velike razširjenosti limfatičnega tkiva pa tudi vse druge organe. Glede na izvor maligne celice, histološko sliko, klinično sliko, potek in prognozo razdelimo maligne limfome na: Hodgkinov limfom(HL) in Nehodkinov limfom (NHL) (10).

Ne Hodgkinovi limfomi vzniknejo najpogosteje v skupini bezgavk (nodalni NHL). Širjenje bolezni po organizmu je nepravilno oziroma nepredvidljivo, ob postavitvi diagnoze so pogosto že razširjeni po drugih skupinah bezgavk, vranici, jetrih, kostnem mozgu (3). Vzniknejo lahko tudi v limfatičnem tkivu zunaj bezgavk (ekstranodalni NHL),

najpogosteje v prebavilih, žrelu, koži, pljučih, ščitnici, možganih in drugih organih (35 odstotkov vseh ne-Hodginovih limfomov) (1).

V klinični sliki sta lahko primarno v ospredju infiltracija kostnega mozga in vdor v periferno kri (limfoidna levkemija), lahko pa se pri malignih limfomih, ki so nastali najprej v bezgavkah, levkemična krvna slika pojavi v poznejši fazi bolezni (levkemizacija malignega limfoma) (1).

V Evropi in Združenih državah Amerike je večina ne-Hodgkinovih limfomov iz celic B (80 do 85 odstotkov) v primerjavi z deželami Daljnega vzhoda, kjer prevladujejo limfomi celic. Limfomi izvirajo praviloma iz ene malignotransformirane celice in so torej monoklonskega izvora. Tako imajo vse tumorske celice enake receptorje za antigen in enako prerazporeditev genov, ki kodirajo sintezo receptorjev. Z analizo genskih prerazporeditev in imunohistokemijsko analizo njihovih proteinskih produktov (na primer lahkih verig imunoglobulinov) ali oboje lahko razlikujemo monoklonske (neoplastične) procese od poliklonskih (reaktivnih) (1,2).

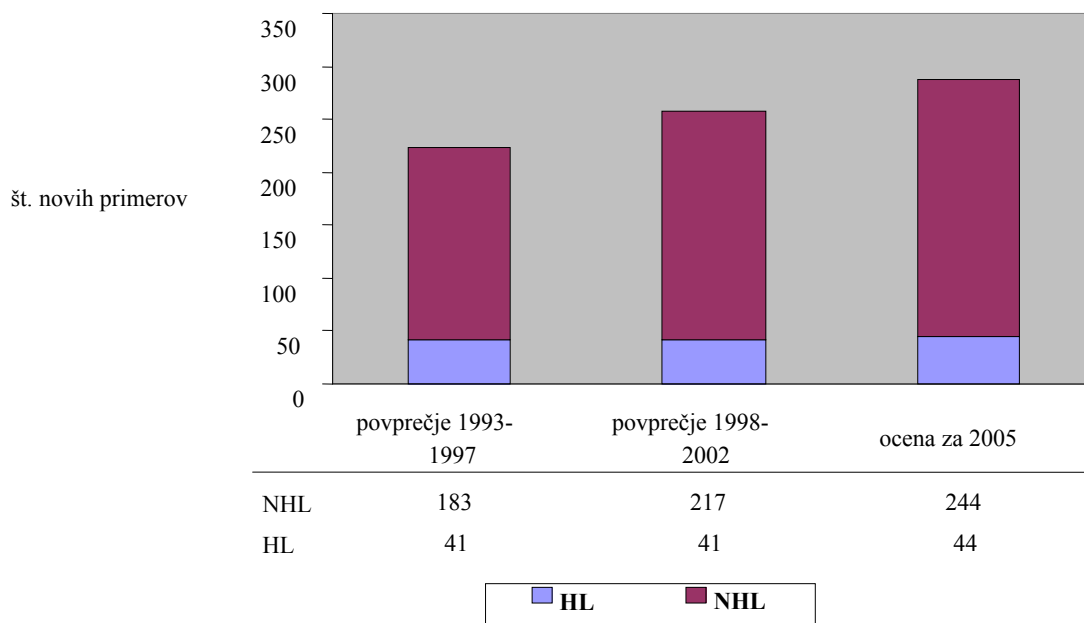
Vzrokov za nastanek NHL je več:

- kromosomske translokacije
- virusna okužba lahko spodbodi izražanje določenih antigenov in vpliva na določanje citokinov ter povzroči nenadzorovano aktivacijo in proliferacijo limfocitov B in T.
- zunanji dejavniki (pesticidi, herbicidi, organske kemikalije...), kemoterapija in radiacija
- stanja imunske pomanjkljivosti
- kronična vnetja pri pacientih z avtoimunskimi boleznimi
- *Helicobacter pylori*

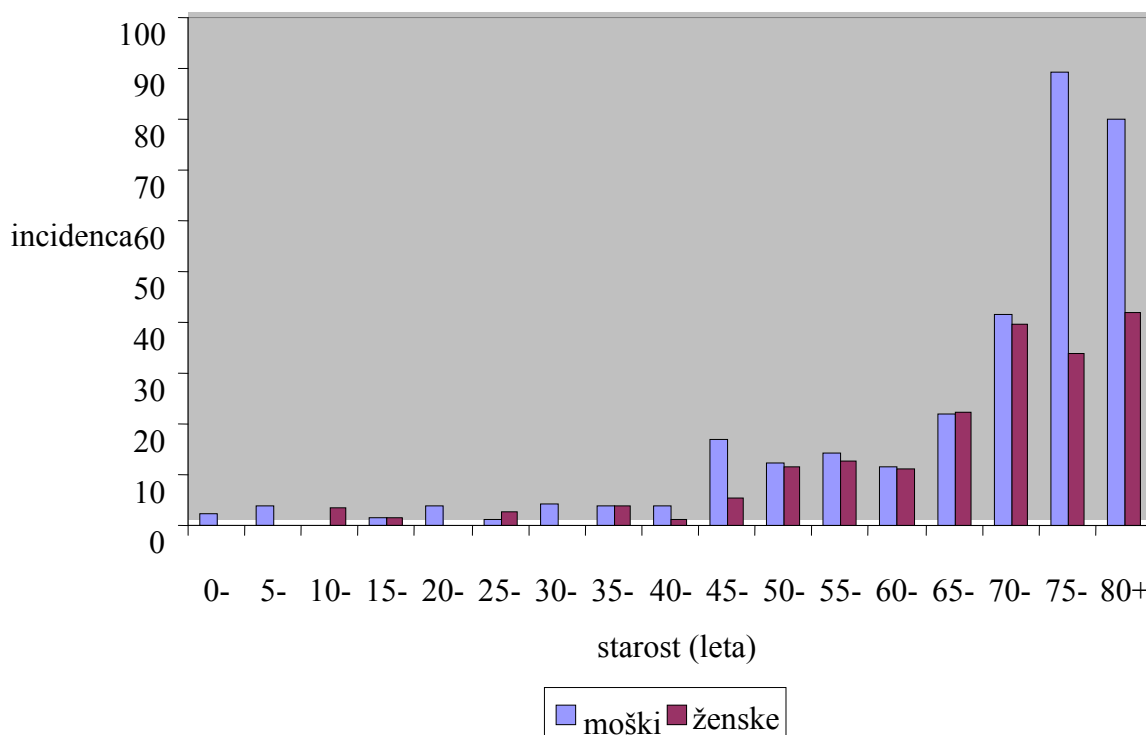
Maligni limfomi predstavljajo približno 2,5-5 % vseh malignomov in se nekoliko pogosteje pojavljajo pri moških (po podatkih za leto 2002 so bili NHL na 9. mestu (2,5%) vseh malignomov pri moških. 31.12.2005 je v Sloveniji živelo 788 bolnikov z HL ter 1600 bolnikov z NHL, letno pa v Sloveniji obravnavajo več kot 250 bolnikov z neodkritimi limfomi (23). Incidenca obolenja narašča (*graf 1*). Incidenca NHL po 20. letu eksponentno narašča (*graf 2*) (22).



Graf 1: Opazovana in napovedana incidenca HL in NHL v Sloveniji 1993-2005 (22)



Graf 2: Incidenca NHL na 100.000 prebivalcev po spolu in starosti (2002) (22)



## 1.2 KRONIČNA LIMFATIČNA LEVKEMIJA

Kronično limfatično levkemijo prištevamo med NHL nizke stopnje malignosti. Je najpogostejša med kroničnimi limfoproliferativnimi boleznimi (1). V Ameriki in Združenih državah Amerike se pojavi pri 3 na 100.000 prebivalcev, medtem ko je na Daljnem vzhodu zelo redka. Predstavlja 30% vseh levkemij. Večina bolnikov je starejših od 60 let, moški pa obolevajo dvakrat pogosteje kot ženske (1).

Vzroka za njen nastanek ne poznamo. Pri več kot 95% bolnikov ima klon levkemičnih celic membranske značilnosti limfocitov B (1). Kadar obravnavamo KLL, mislimo ponavadi na B-KLL. Pri nas je KLL-T z značilnostmi limfocitov T zelo redka bolezen. Klon zrelih levkemičnih limfocitov B se kopiči predvsem v kostnem mozgu in limfatičnih organih, kjer se normalno nahajajo in prehajajo v kri (1).

Večina bolnikov ob ugotovitvi bolezni nima nobenih težav in ponavadi KLL ugotovimo slučajno pri pregledu krvi ali pa si bolniki otipljejo povečane bezgavke. Kadar bolezen slučajno ugotovimo pri pregledu krvi (limfocitoza več kot  $5 \times 10^9/l$ ) in je omejena na kostni mozeg (infiltracija kostnega mozga z več kot 30% limfocitov), govorimo o klinični stopnji A. Pri razdelitvi KLL po razvojnih stopnjah ločimo pet enakovrednih področij povečanih bezgavk in organov: povečane bezgavke v vratu, pazduhah in dimljah ter povečana vranica in jetra. Pri klinično razvojni stopnji A najdemo povečane bezgavke v manj kot treh območjih (9).

**Tabela 1:** Razdelitev kronične limfatične levkemije po klinično razvojnih stopnjah (1)

---

<u>Stopnja A:</u>	povečane bezgavke in/ali organi v manj kot treh območjih, brez anemije in trombocitopenije
<u>Stopnja B:</u>	povečane bezgavke in/ali organi v treh ali več območjih, brez anemije ali trombocitopenije
<u>Stopnja C:</u>	anemija (koncentracija hemoglobina $< 100g/l$ ) in/ali trombocitopenija (število trombocitov $< 100 \times 10^9/l$ s povečanimi bezgavkami ali brez ali organov)

---

Ločimo 5 enakovrednih območij povečanih bezgavk in organov: jetra, vranica, povečane bezgavke v vratu, pazduhah in dimljah

Velikokrat si bolniki sami otipajo povečane bezgavke v vratu, pazduhah in dimljah. Bezgavke so povečana somerno na obeh straneh telesa, so posamezne, neboleče, prožne in premakljive od podlage (1).

V napredovalni stopnji bolezni bolniki hujšajo, se ponoči potijo in ponavadi izgubijo težo. Pri pregledu ugotovimo povečane bezgavke in vranico (splenomegalijo) zaradi kopičenja limfocitov v kostnem mozgu, bezgavkah, vranici in jetrih. Bolniki imajo pogosto okužbe, zaradi pomanjkanja imunoglobulinov, nevtropenije in nefunkcionalnih limfocitov. Značilna je tudi trombocitopenija in slabokrvnost, kot posledica nadomeščanja kostnega mozga z levkemičnimi celicami ali kot posledica avtoimunega dogajanja (1).

### **1.2.1 Diagnostični postopki**

V krvi najdemo zvišano število levkocitov ( $10-30 \times 10^9/l$ ). Večinoma prevladujejo mali limfociti z gostim grudastim kromatinom in ozkim robom citoplazme. Običajno je v krvi manj kot 2% prolimfocitov. Bolezen ima hitrejši in bolj neugoden potek, če je v krvi 10 do 55% prolimfocitov ali trisomija kromosoma 12.

Pri napredovalni bolezni se pojavita anemija in trombocitopenija. Anemija je normocitna normokromna, zaradi nezadostnega nastajanja eritrocitov. Če nastane avtoimunska hemolitična anemija, je pogosto makrocitna. Pri 20% bolnikov ugotovimo pozitivni Coombsov test, hemolitična anemija pa se razvije le pri 8% bolnikov. V hipercelularnem kostnem mozgu se kopičijo zreli limfociti (običajno več kot 30%). Infiltracija kostnega mozga z malimi limfociti je pri B-KLL na osnovi histološkega pregleda v začetnem obdobju bolezni nodularna in/ali intersticijska, pri napredovali bolezni pa difuzna (1).

Pri pregledu kostnega mozga najdemo večje število zrelih limfocitov (30-95%).

S pretočno citometrijo ločimo med B (95%) in T (5%) KLL (9). Koncentracija serumskega imunoglobulina je zmanjšana (11).

Biopsija ali punkcija bezgavke je potrebna le v primerih hitre rasti bezgavk pri bolniku s KLL zaradi izključitve možne preobrazbe v limfom visoke stopnje malignosti ali v Richterjev sindrom (1).

Potek KLL lahko poteka zelo različno, odvisno od poteka bolezni in tudi sočasne prisotnosti drugih bolezni. Pri bolnikih, kjer je bila bolezen odkrita slučajno, včasih ne potrebujejo nikakršnega zdravljenja tudi do 10 ali več let, medtem ko bolniki s stopnjo C preživijo 2,5 let. Večja je nagnjenost k sekundarnih malignomov. Pri približno 3,5% bolnikov s B-KLL se v končnem obdobju bolezni razvije preobrazba, pri 3,0% bolnikov v difuzni velikocelični B limfom, pri 0,5% pa Hodginovem limfomu podobna klinična slika, posebno pri tistih, ki so prejeli analoge purinskih nukleotidov. V bezgavkah, ki se bulasto razraščajo in zlepijo, se tedaj kopičijo celice, ki so podobne prolimfocitom, limfoblastom in imunoblastom. V teh primerih govorimo o Richterjevem sindromu. Bolezen je v tem primeru neozdravljiva. KLL pogosto poteka razmeroma hitro. Bezgavke se postopno večajo, pojavi se anemija in trombocitopenija. Bolniki najpogosteje umrejo zaradi posledic okužb (9).

Trisomija 21 je običajno povezana z večjim deležem celic, ki niso podobne malim limfocitom. Za trisomijo A je značilen hitrejši potek bolezni in je običajno povezana z večjim deležem celic, ki niso podobne malim limfocitom. Enako velja za tiste bolnike z delecijo 11q22-23 kromosoma in zelo povečanimi bezgavkami. Hitrejši potek bolezni napoveduje prisotnost nemutiranega gena za variabilni del težke verige imunoglobulina (IgV<sub>H</sub>) in zeta pridruženega proteina molekulske mase 70 kD (ZAP-70) v levkemičnih celicah. Kromosomska nepravilnost 13q14 je povezana z dolgim preživetjem bolnikov s KLL. Neugoden potek bolezni je tudi pri difuzni infiltraciji kostnega mozga z malimi limfociti. Bolniki s KLL in celičnimi označevalci CD38 na limfocitih imajo prav tako neugoden potek bolezni (1).

T-KLL z značilnostmi limfocitov T je v zahodnih državah in pri nas zelo redka bolezen, manj kot 5% vseh primerov KLL, medtem ko je na Japonskem najpogostejša oblika KLL. V klinični sliki pogosto ugotovimo povečano vranico in jetra, pa tudi infiltrate v koži, prizadetost osrednjega živčevja in spolnih žlez. Za diagnozo je potrebno določiti celične označevalce. Potek bolezni je običajno hitrejši kot pri B-KLL, prognoza je resna (1).

O ozdravitvi kronične limfatične levkemije do sedaj še ni dokazov, kot tudi ni dokazov o podaljšanju življenja, kadar so zdravili bolnike v stopnji A. Za zdravljenje se odločimo kadar bolezen napreduje in se pojavi: anemija, trombocitopenija, simptomi povezani z boleznijo, povečane bezgavke, podvojitev limfocitov v manj kot 6 mesecih in preobrazba v Richterjev sindrom ali prolimfocitno levkemijo (1,3).

Zdravljenje poteka z klorambucilom (Leukeran) v odmerku 0,1 do 0,2 mg po./kg telesne teže dnevno neprekinjeno, ali v odmerku 10 mg po./m<sup>2</sup> telesne površine, 5 dni in ponovimo na 4 tedne. Največji odstotek popolnih remisij (70%) dosežejo pri dajanju klorambucila 15 mg na dan do popolne remisije bolezni oziroma znakov citotoksičnosti (hude nevtropenije in trombocitopenije) do največ 6 mesecev (1).

Bolnike s hudo anemijo in/ali trombocitopenijo zdravimo s klorambucilom v odmerku 10 mg po/m<sup>2</sup> telesne površine dnevno, 5 dni in prednizonom 40 mg po./m<sup>2</sup> telesne površine dnevno 5 dni ter ponavljamo na 4 tedne. Klorambucil dajemo v obliki tablet, zmanjša število limfocitov in bezgavke in/ali vranico. Na začetku se daje prednizon do izboljšanja anemije, običajno 2 do 3 tedne. Priporočljivo je, da zdravljenje ponovimo pet do šestkrat. Kot zdravilo za zdravljenje KLL se uporablja tudi fludarabin, ki se ga daje kot monoterapija ali v kombinaciji z drugimi citostatiki v obliki tablet ali v intravenozni obliki. Fludarabin zavira sintezo DNK ter na ta način sproži apoptozo rakastih limfocitov. Zdravljenje s fludarabinom je učinkovito pri 70 do 90% bolnikov, ki prej niso bili zdravljeni in pri 50 do 60% bolnikov z B-KLL, ki so jih zdravili z drugimi zdravili. Bolezen se ponavadi poslabša po 21 do 33 mesecih. Večji delež izboljšanj so dosegli s kombinacijo fludarabina in ciklofosfamida ali fludarabina in mitoksantrona. Ta način zdravljenja se priporoča pri mlajših bolnikih. Če so pojavijo težave zaradi povečane vranice jo obsevamo z ionizirajočimi žarki (9).

Pri bolnikih z B-KLL dajemo velik poudarek na zdravljenje s kombinacijo fludarabina in monoklonskih protiteles, kot sta rituksimab (proti CD20) in alemtuzumab (proti CD52). Monoklonsko protitelo se veže na antigene na površini celic novotvorbe in deluje direktno citotoksično ali preko aktivacije komplemента ali spodbuditve apoptoze. Pri bolnikih z B-KLL, ki so zdravljeni ali neozdravljeni, so prejeli fludarabin 5 dni zapored enkrat na mesec in rituksimab  $375 \text{ mg/m}^2$  intravensko enkrat na mesec 4 mesece, so ugotovili 33 % popolnih remisij bolezni in 55 % delnih remisij. Alemtuzumab so dajali rezistentnim bolnikom na druge načine zdravljenja v odmerku 30 mg intravensko trikrat na teden 12 do 16 tednov. Odzivnost na zdravljenje, večinoma v obliki delne remisije bolezni, je bila 33 do 53 % (1,9).

Kadar nevedeni načini zdravljenja niso učinkoviti, poskusimo s kombinacijo citostatikov CHOP (cikloklorofosamid, hidroksidaunorubicin, vinkristin, prednizon) ali z drugimi analogi purina (kladribin in pentostatin). Zdravim, dokler ne dosežemo zboljšanja ali zmanjšanja težav. Popolno remisijo bolezni dosežemo le pri 10% do 20% bolnikov, vendar tudi njihovo preživetje ni znatno daljše od tistih, kjer popolne remisije nismo dosegli. Še uspešnejše je zdravljenje s kombinacijo CHOP in rituksimaba (R-CHOP). Kortikosteroide dodamo, če imajo bolniki anemijo in trombocitopenijo.

Presaditve matičnih krvnih celic so indicirane pri mlajših bolnikih s hitro potekajočo se boleznijo. Smrtnost zaradi zapletov med presaditvijo je velika. Obetavne so t.i. nemieloablativne presaditve MKC z uporabo monoklonskih protiteles (9).

### 1.3 TUMORSKI OZNAČEVALCI

Maligna celica nastane kot rezultat maligne transformacije, iz katere nastane ob vsaki nadaljnji delitvi nova maligna celica. Maligno spremenjene celice pridobijo v tem procesu nekaj novih lastnosti, po katerih se razlikujejo od nemalignih celic istega izvora. Tarča delovanja karcinogenih agensov je predvsem celična DNA (3). Še posebej so pomembne mutacije tistih genov, ki nadzorujejo rast in delitev celic (t.i. zgodnji geni oz. protoonkogeni). Nastale spremembe se odražajo v spremenjeni morfologiji, fiziologiji in rasti (obnašanju) celice. Te razlike med normalnimi in maligno spremenjenimi celicami uporabljamo za dokazovanje malignega procesa oz. malignih celic. Snovi, ki jih pri tem spremljamo, imenujemo tumorski označevalci. Glede na to, da se tumorske celice od normalnih razlikujejo na različnih nivojih, se tudi tumorski označevalci med seboj razlikujejo in predstavljajo razmeroma širok pojem, ki zajema poleg različnih snovi tudi procese v celicah. Tako nam kot tumorski označevalci na primer lahko služijo podatki o prisotnosti produktov onkogenov v celicah, o prisotnosti ali odsotnosti produktov tumorskih supresorskih genov, ali podatki o DNA ploidnosti celic in deleža celic v S fazi celičnega ciklusa (stopnja proliferacije) (6).

Organi in tkiva se v organizmu obnavljajo z nadomeščanjem odmrlih celic z nediferenciranimi matičnimi celicami, ki so sposobne proliferacije in nadaljnje diferenciacije. Med procesom diferenciacije zgubijo sposobnost hitre delitve in migracije, ter razvijejo za organe in tkiva značilno morfologijo in funkcionalnost. Večina malignih bolezni verjetno nastane tako, da celice spremenijo svojo normalno razvojno pot in se spremenijo (transformirajo) v rakave pod vplivom bioloških, kemijskih ali fizikalnih agensov. Proces preobrazbe celic se imenuje karcinogeneza, agensi, ki sprožijo, pa karcinogeni agensi (8).

Tumorske celice se od normalnih razlikujejo na različnih nivojih in glede na to, se tudi tumorski označevalci razlikujejo in predstavljajo razmeroma širok pojem, ki zajema poleg različnih snovi tudi procese v celicah. Tako nam kot tumorski označevalcu na primer služijo membranski antigeni, hormoni, encimi, polamini, nukleozidi, produkti onkogenov,

produkti tumorskih supresorskih genov ali podatki o DNA ploidiiji celic in deležu celic v S-fazi celičnega ciklusa (6).

Določanje tumorskih označevalcev lahko pomaga pri diagnozi bolezni in napredovanju njenega poteka, pri določanju stadija bolezni in izbiri načina zdravljenja ter pri zgodnjem odkrivanju ponovitve in razširitve bolezni.

Za lažjo interpretacijo rezultatov moramo napraviti več določitev tumorskih označevalcev v različnih stadijih bolezni ter spremljati gibanje njihovih koncentracij. Pri tem upoštevamo biološko razpolovno dobo, ki predstavlja čas, v katerem prvotna koncentracija pade na polovico. To v praksi pomeni, da pri bolniku z visokimi izhodiščnimi koncentracijami označevalcem ne smemo pričakovati, da se bodo te normalizirale takoj po uspešnem zdravljenju, ampak moramo upoštevati njihov biološki razpolovni čas in šele potem oceniti uspeh zdravljenja. Biološki razpolovni čas tumorskih označevalcev je različen in se giblje od nekaj ur do nekaj tednov (7).

### **1.3.1 Določanje tumorskih označevalcev v serumu**

Koncentracija tumorskih označevalcev je odvisna od več dejavnikov. Pogojena je z številom celic, ki proizvajajo tumorske označevalce, in s tem od velikosti tumorja, njegove razširjenosti in stadija. Koncentracija tumorskega označevalca je odvisna še od hitrosti sinteze, hitrosti sproščanja iz tumorskih celic ali celičnih površin, stopnje izražanja tumorskih označevalcev, tipa tumorja, prekrvavljenosti tumorja, stopnje nekroze tumorskega tkiva, razpolovnega časa tumorskega označevalca in vpliva protiteles (5).

Tumorski označevalci imajo v telesnih tekočinah nizke koncentracije in za njihovo dokazovanje potrebujemo visoko senzitivno (občutljivo) tehnologijo. Tehnike, ki jih danes uporabljamo, temeljijo bolj ali manj na podobnem principu, to je na določanju kompleksov antigena in protiteles. Najbolj razširjene tehnike so radioimunska metoda, encimskoimunska in luminimetrično-immunska metoda. Razlikujejo se po spojini, ki je vezana na detekcijska protitelesa, in po načinu detekcije nastalih kompleksov. Vse našteje metode imajo sposobnost dokazovanja izredno nizkih koncentracij antigena, tako da velikih razlik v njihovi senzitivnosti ni. Specifičnost metod je odvisna od kvalitete



protiteles ter od specifičnosti protiteles za posamezen antigen oziroma tumorski označevalec (6).

Vse do danes še ne poznamo antigenske strukture, ki bi bila prisotna samo v malignih tumorskih celic, kar pomeni, da protitelesa proti posameznim tumorskim označevalcem lahko navzkrižno reagirajo tudi z drugimi antigenskimi strukturami. Zaradi tega ne moremo govoriti o 100-odstotnem specifičnem označevalcu ali metodi za spremljanje prisotnosti malignih tumorskih celic. Pri vrednotenju rezultatov moramo vedno imeti v mislih, da ni samo maligna bolezen vzrok za povišane vrednosti tumorskih označevalcev, ampak da je več dejavnikov, ki vplivajo na njihovo koncentracijo (6).

### **1.3.2 Senzitivnost in specifičnost tumorskih označevalcev**

Razvoj molekularne genetike in biotehnologije omogoča izolacijo izredno čistih in majhnih antigenskih struktur. Zahvaljujoč temu je danes mogoče:

- i. Selektivno izbrati strukture, ki se pojavljajo večinoma v malignem tumorskem tkivu in so le redko prisotne v nemalignih tkivih, ter
- ii. Pridobiti zadostne količine čistih antigenskih struktur za imunizacijo in tvorbo protiteles.

Čim bolj čista in čim manjša je namreč antigenska struktura, tem bolj specifična so protitelesa, kar je predpogoj za to, da čimbolj zmanjšamo verjetnost neželenih navzkrižnih vezav s podobnimi antigenskimi strukturami. Kljub temu še danes ne poznamo antigenske strukture, ki bi služila kot idealen tumorski označevalec in bila prisotna samo v tumorskem tkivu (7).

Lastnosti idealnega tumorskega označevalca so, da naj bi bil prisoten samo v tumorskih celicah, značilen naj bi bil za organ in vrsto tumorja, določljiv v serumu na začetku razvoja tumorja, njegove serumske koncentracije pa naj bi odražale dinamiko rasti tumorske mase. Poleg tega naj bi bile serumske koncentracije uporabne kot napovedni dejavnik poteka bolezni pri bolnikih z določenim tipom tumorja (7).

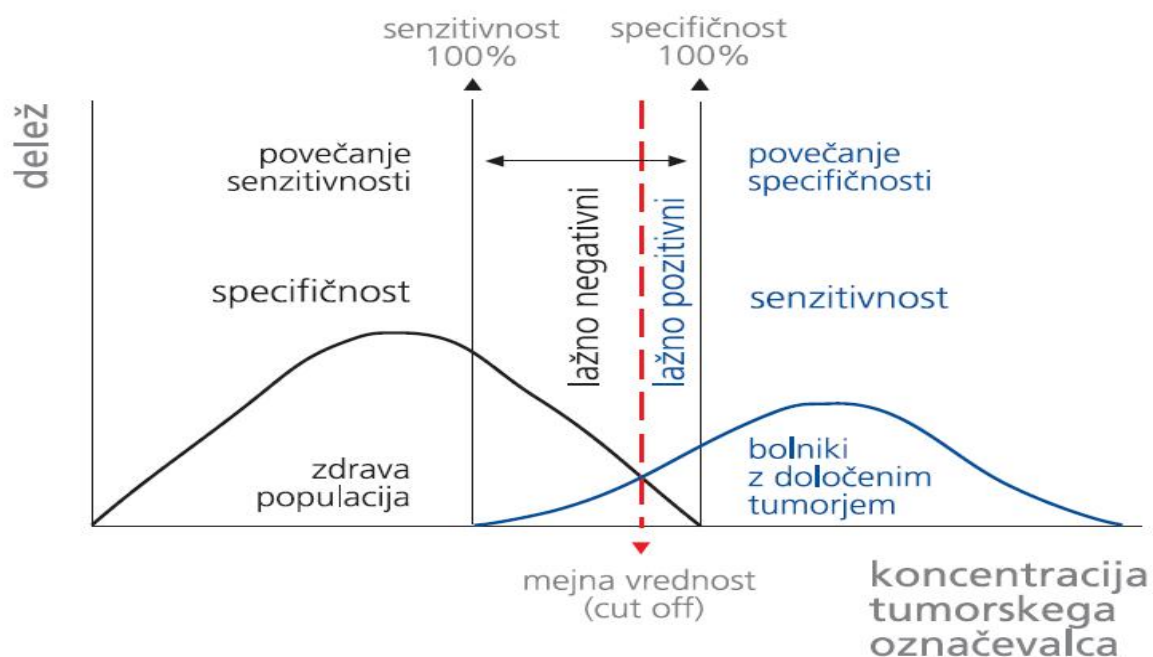
Antigenska struktura nam ni znana, ki bi obstajala samo v malignih tumorskih celicah, kar pomeni, da lahko protitelesa proti posameznim tumorskim označevalcem navzkrižno

reagirajo tudi z drugimi antigenskiimi strukturami. Pri vrednotenju rezultatov moramo upoštevati dejstvo, da maligna bolezen ni edini vzrok za povišane vrednosti tumorskih označevalcev, ampak da obstaja več faktorjev, ki vplivajo na njihovo koncentracijo.

Vlogo in uporabno vrednost posameznega tumorskega označevalca in metode za določeno vrsto rakave bolezni natančno opredelimo s pojmom senzitivnost in specifičnost. Senzitivnost označevalca pove, pri kolikšnem deležu bolnikov z določenim tumorjem je serumski (urinski, plazemski, likvorski) nivo označevalca povišan. Čim bolj je označevalec senzitivnen, tem večji je delež bolnikov z istovrstnim tumorjem, pri katerih je nivo povišan, zato pričakujemo minimalno število lažno negativnih določitev (6).

Specifičnost predstavlja delež preiskovancev, ki nimajo določene maligne bolezni in imajo normalen nivo označevalca. Označevalec je tem bolj specifičen, čim manjkrat je prisoten pri ljudeh brez določene vrste tumorja oz. čim manj je lažno pozitivnih določitev.

Senzitivnost in specifičnost določamo pri izbrani mejni vrednosti. S spremljanjem mejne vrednosti lahko povečujemo senzitivnost in zmanjšujemo specifičnost in obratno (6,7).



**Slika 1:** Grafičen prikaz senzitivnosti in specifičnosti glede na koncentracijo tumorskega označevalca (7)

#### **1.3.4. Pomanjkljivosti tumorskih označevalcev**

Idealnega tumorskega označevalca še ni, ker snovi, ki se jih uporablja kot tumorske označevalce, ne nastajajo samo kot spremljevalci rakovega procesa. Pomanjkljivosti doslej znanih tumorskih označevalcev so:

- nezadostna specifičnost za neko vrsto rakove bolezni,
- tvorba označevalcev v velikih koncentracijah pri nerakovih procesih (različna vnetja, benigni tumorji, bolezni jeter in trebušne slinovke),
- tvorba pri različnih fizioloških stanjih- nosečnost, menstruacija, lektacija
- tvorba v povsem zdravih tkivih

Posledica tega je pojav lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov. Lažno pozitivni rezultati so lahko posledica vnetnih procesov, benignih bolezni jeter ter posledično motnje metabolizma in izločanja, motenj v delovanju ledvic, obsežne tumorske nekroze.

Lažno negativni rezultati pa so lahko posledica popolnega izostanka sinteze, slabo izražene antigenske determinante ali tvorbe le v nekaterih tumorskih celicah, slabe prekrvavitve tumorja, nastajanje imunskih kompleksov z organizmu lastnimi protitelesi, hitrega razpada in izločanja antigenov (5).

#### **1.3.5 Razdelitev tumorskih označevalcev**

Tumorske označevalce lahko razdelimo na več načinov: po kemični strukturi, po mestu nastanka, po vrstah tumorskih bolezni, pri katerih naj bi jih določali in tako naprej.

Tumorske označevalce razvrstimo glede na njihove biokemične lastnosti ali mesto nastanka na: onkofetalne proteine, hormone in/ali karcinoplacentarne antigene, encime, tumor spremljajoče antigene, posebne serumske proteine in skupino mešanih tumorskih označevalcev (6).

#### **Onkofetalni proteini**

Onkofetalni proteini so antigeni, ki normalno nastajajo med embrionalnim razvojem. Pri odraslih je njihova tvorba omejena in ustavljena. Povečane koncentracije teh antigenov pri

odraslih so posledica ponovne aktivacije nekaterih genov, ki nadzorujejo rast celic in so neposredno v povezavi z malignim procesom.

Onkofetalni proteini nastajajo v embrionalnem tkivu ploda med njegovim razvojem. V tkivu odraslih ljudi antigeni ne nastajajo ali pa se tvorijo v majhnih količinah. Tipična predstavnik sta karcinoembrionalni antigen (CEA) in alfa-feto protein (AFP) (6,5).

### **Hormoni**

Maligne tvorbe lahko sprožijo spremembe v sintezi in izločanju različnih hormonov. Kvantitativne kot tudi kvalitativne spremembe v sintezi in izločanju nekaterih hormonov so torej lahko pokazatelji prisotnosti malignega procesa in jih spremljamo kot tumorske označevalce (5).

O kvantitativnih spremembah govorimo takrat, ko se tumorji razvijejo v tkivu endokrinih žlez in se zaradi maligne spremembe celic produkcija hormona poviša ali zniža. V to skupino uvrščamo hormone malignih endokrinih tumorjev, kot so parathormon, insulin, prolaktin, kateholamini in drugi (5).

Kvalitativne spremembe nastanejo takrat, ko maligno spremenjene celice nekaterih organov (pljuča, dojka, želodec, centralno živčevje, jajčniki) začnejo tvoriti hormone - to je t.i. ektopična tvorba hormonov (npr. kalcitonin in parathormon pri raku dojke, lipotropin pri karcinoidnih tumorjih, kalcitonin, insulin, parathormon pri malignomih timusa) (5).

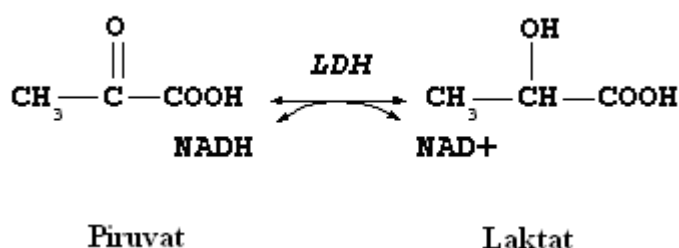
### **Encimi**

Kot tumorski označevalci nam lahko služijo tudi nekateri encimi. Povečana koncentracija encima v serumu je rezultat malignega procesa v organizmu. V to skupino spadajo: prostatična kislina fosfotaza, alkalna fosfotaza, nevronska specifična enolaza.

V skupino (nespecifičnih) označevalcev spada še laktat dehidrogenaza (LDH), ki je pogosto povišana pri bolnikih z limfomi in germinalnimi tumorji (6,5).

### LAKTAT DEHIDROGENAZA (LDH)

Laktat dehidrogenaza je encim, ki sodeluje pri anaerobni razgradnji glukoze. Laktat dehidrogenaza je v celici lokaliziran izključno v citoplazmi, zato se aktivnost encima poveča že pri lažjih poškodbah tkiva. LDH se nahaja v vseh celicah organizma, največ ga je v srcu, jetrih, skeletnih mišicah (prečno progastih), v ledvicah, trebušni slinavki, eritrocitih, trombocitih in levkocitih. Manj se ga nahaja v pljučih, gladkem mišičju in možganih (21).



LDH je prenašalec vodika prek koencima  $\text{NAD}^+$ . Končni produkt glikolize je L-laktat, ki nastane iz piruvata. Reakcija je reverzibilna, smer reakcije je odvisna od pH.

### Izoencimi LDH

LDH je tetramerna molekula. Od kombinacij monomerov je odvisna izoencimska oblika LDH. Ločimo pet izoencimov LDH. Molekularna teža posameznega izoencima je 128000 daltonov, molekularna teža posamezne polipeptidne verige je 32000 daltonov.

Poznamo pet izoencimov LDH:

- Izoencime sestavljata dve polipeptidni verigi: H (heart) in M (muscle) v petih kombinacijah: HHHH (LDH-1), HHHM (LDH-2), HHMM (LDH-3), HMMM (LDH-4) in MMMM (LDH-5)
- Frakciji LDH-1 in LDH-2 izvirata predvsem iz srčne mišice, ledvic in eritrocitov. LDH-3 izvira iz endokrinih žlez (pankreas), pljuč, limfnih vozlov, trombocitov in vranice. LDH-4 in LDH-5 pa izvirata iz jeter in skeletnih mišic (21).

LDH se v serumu določa kot pomoč pri diagnosticiranju srčnega infarkta, akutnih obolenjih jeter, akutnih obolenjih ledvic, megaloplastni anemiji, infarktu pljuč, različnih obolenjih mišic in malignih obolenjih (21).

### **Tumor spremljajoči antigeni**

To je heterogena skupina označevalcev, ki zajema različne membranske strukture tumorskih celic. Sodobna tehnologija izkorišča možnost tvorbe specifičnih monoklonskih protiteles proti določeni antigenski strukturi, ki je najbolj značilna za določene tumorske celice. Zato so označevalci v tej skupini bolj specifični za določeno vrsto malignega tumorja kot ostali in pogosto njihove serumske koncentracije bolj natančno odražajo rast ali zmanjševanje tumorske mase. Ker pa dandanes še vedno ne poznamo antigenske strukture, ki bi bila strogo specifična samo za rakave celice, so tudi ti označevalci pogosto prisotni v zdravem tkivu, kot tudi pri nemalighnih boleznih. Pri bolnikih z rakom pa so serumske koncentracije teh označevalcev statistično značilno višje, kot pri zdravih odraslih in bolnikih z nemalighnimi boleznimi (7).

Med tumor spremljajoče antigene spadajo: karcinomski antigen 15-3 (CA 15-3), mucinski karcinomski antigen (MCA), karcinomski antigen 125 (CA 125), karcinomski antigen 19-9 (CA 19-9), prostatični specifični antigen (PSA).

### **Posebni serumski proteini**

Med posebne serumske proteine uvrščamo različne proteine. Med bolj znanimi je feritin, ki je odgovoren za znotrajcelično vezavo železa in detoksikacijo (npr. vezava prostih radikalov). Pod normalnimi pogoji najdemo visoke koncentracije tega proteina v jetrih, vranici in v kostnem mozgu. Iz serumskih koncentracij ter odnosa različnih podenot tega encima lahko sumimo na maligno obolenje (H-podenota je tista, ki prevladuje v malignem tumorskem tkivu, medtem ko je v normalnem tkivu prevladujoča HL-podenota). Normalen nivo feritina v serumu se giblje od 8 - 440 ng/ml. Povišane koncentracije opazamo pri bolnikih z akutno levkemijo, limfomi (posebej Hodgkinovimi limfomi), rakom pljuč, jeter in prostate (7,8).

Med posebne serumske proteine uvrščamo poleg feritina še tiroglobulin, beta-2-mikroglobulin in S-100 protein.

## **BETA-2-MIKROGLOBULIN**

Beta-2-mikroglobulin je protein, ki je prisoten na celični membrani skoraj vseh diferenciranih celic in je identičen lahki verigi HLA. Beta-2-mikroglobulin zasledimo v vseh telesnih tekočinah in sicer vezanega na HLA ali prostega. V serumu je koncentracija lahko povečana zaradi povečane sinteze samega proteina kot posledica hitrejše delitve celic, hiter razpad celičnih membran in odmiranje celic, ter močnejše delovanje imunskega sistema, kakor tudi zmanjšana filtracijska kapaciteta ledvic (98% se ga izloča preko ledvic). Povišane serumske koncentracije lahko zasledimo pri bolnikih z rakom pljuč, dojke, trebušne slinavke, širokega črevesa in danke in pri limfomih (13).

Beta-2 mikroglobulin je majhna podenota z molekulo MHC razreda I. Molekula MHC razreda I, je ista kot HL-A antigen, ki je prisoten na površini skoraj vseh celic z jedri v telesu.

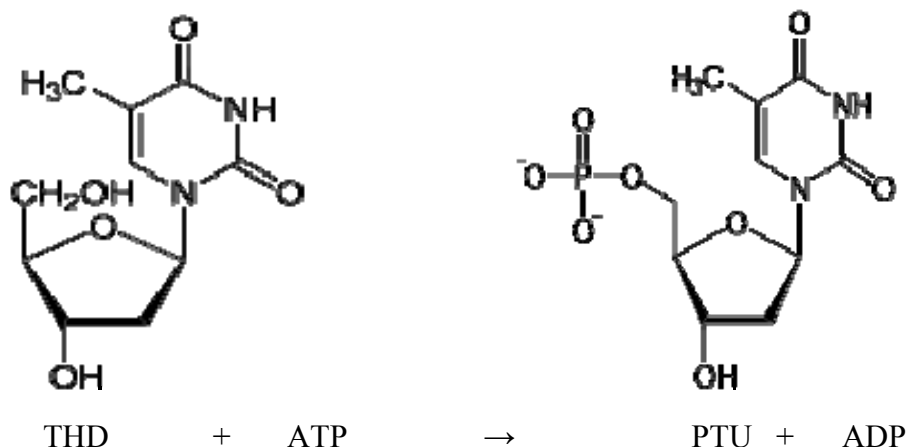
### **Skupina različnih tumorskih označevalcev**

Ta skupina zajema označevalce, katerih tvorba izredno dobro spremlja spremembe v hitrosti proliferacije celic. To je heterogena skupina označevalcev, ki niso specifični za posamezne tumorje, ampak na splošno nakazujejo na možnost obstoja maligne bolezni. V to skupino uvrščamo poliamine, nukleozide in tkivne polipeptidne antigene (TPA) (6).

## TIMIDIN KINAZA

Timidin kinaza je encim pirimidinske presnovne poti, sodeluje pri sintezi DNA, zato je od celičnega cikla odvisni označevalec.

Timidin kinaza katalizira reakcijo:



THD je deoksitimidin, ATP je ( nosilec energije v celici) adenzin 5`-trifosfat, PTU je deoksitimidin 5`-fosfat in ADP je adenzin 5`-difosfat (12).

Timidin kinaza ima ključno vlogo pri sintezi DNA, kot tudi pri celični delitvi. Timidin kinaza sodeluje pri reakciji uvedbe deoksitimidina v DNK. Deoksitimidin je prisoten v telesnih tekočinah kot posledica razgradnje DNA mrtvih celic. Timidin kinaza je potrebna za delovanje mnogih protivirusnih zdravil. V klinični kemiji se uporablja kot označevalec pri širjenju malignih bolezni, predvsem za hematološke maligne bolezni (10).

Timidin kinaza (TK) pomaga pri presoji razširjenosti bolezni pri bolnikih z levkemijo, limfomom, možganskimi tumorji, drobnoceličnim rakom pljuč ali rakom dojke. Pri zdravih ljudeh je koncentracija encima timidin kinaze zelo nizka. Raven timidin kinaze v serumu služi kot merilo za maligno proliferacijo, kot posredno merilo za agresivnost tumorja.

Timidin kinaza sodeluje pri sintezi DNA in katalizira fosforilacijo timidina do timidin monofosfata. Dejavnost timidin kinaze se dramatično povečuje v fazi S celičnega cikla. Njene aktivnosti so pokazale, da je zanesljiv marker z proliferativno dejavnostjo tumorskih celic. Timidin kinaza se v človeških celicah pojavi v obliki dveh izoencimov, citosolni (TK1) in mitohondrijski (TK2) obliki. Samo oblika TK1 je povezana s celičnem ciklom.



Veliko kliničnih študij je poročalo o povišani TK na ravni številnih neoplazij. V večini študijah je bil TK uporabljen za spremljanje prognoze in zdravljenje hematoloških malignih bolezni. Izkazalo se je, da povišane vrednosti serumske koncentracije timidin kinaze napoveduje veliko tveganje za napredovanje bolezni pri nizko-razrednih Ne-Hodginovih limfomih in pri kronično limfatičnih levkemijah (KLL). Timidin kinaza se v serumu določa kot pomoč pri razlikovanju med bolniki z multipli mielomom in tistimi z monoklonalno gamopatijo neopredeljenega pomena (MGUS) (10).

Zelo visoke vrednosti timidin kinaze zasledimo pri bolnikih z akutno levkemijo. Študije so pokazale da serumske koncentracije timidin kinaze lahko kažejo agresivnost levkemičnih celic in napovejo odziv zdravljenja in dolžino preživetja.

Pri normalnih osebah je koncentracija encima timidin kinaze nizka. Koncentracija timidin kinaze je odvisna od umirajočih tumorskih celic. Raven timidin kinaze v serumu služi kot merilo za maligno proliferacijo in kot posredno merilo agresivnosti tumorja (10).

## **2. NAMEN DELA**

Določanje tumorskih označevalcev nam lahko pokaže prisotnost ali lastnost raka. V našo raziskavo so bili vključeni bolniki s kronično limfatično levkemijo. Z določitvijo serumske koncentracije TK, LDH in B2MG smo želeli dokazati možen vpliv povišanih koncentracij tumorskih označevalcev pri diagnozi bolezni, napovedovanju njenega poteka, pri določanju stadija bolezni in razširitvi bolezni. Želeli smo tudi dokazati kateri parameter je boljši za dokazovanje bolezni oz. kakšna je njihova medsebojna povezanost.

### 3. EKSPERIMENTALNI DEL

V šestih mesecih, od sredine februarja do konca junija 2008, je bilo na Kliničnem oddelku za hematologijo na Polikliniki v Ljubljani odvzetih 75 vzorcev, med katerim je bilo 48 (64%) moških in 27 (36%) žensk. Povprečna starost odvzetih pacientov je 68,4.

Vsi pacienti so bili na rednem pregledu, katerim je bila predhodno postavljena diagnoza kronična limfatična levkemija. Med preiskovanci je 12 vzorcev, pri katerih se je bolezen ponovno pojavila (relaps) in 63 vzorcev pri katerih je stanje stabilno (remisija).

Preiskovancem je bila odvzeta kri v epruveto za vakuumski odvzem brez dodatkov. Epruveto smo ustrezno označili in nato odvzeti vzorec centrifugirali 10 min pri 3500 obratih pri sobni temperaturi. Vsem našim vzorcem je bila izmerjena koncentracija encima timidin kinaze, LDH in  $\beta$  2-mikroglobulina.

#### 3.1 TIMIDIN KINAZA

##### 3.1.1 Princip metode

Koncentracijo timidin kinaze smo določili na DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> analizatorju, uporabili smo LIAISON<sup>®</sup> Thymidine kinase reagente.

Metoda, ki smo jo uporabili za določitev koncentracije timidin kinaze v serumu je indirektna metoda, ki poteka v dveh korakih in temelji na kemiluminescenci.

V prvi stopnji encimske reakcije timidin kinaza v vzorcu pripomore k temu da se AZT (3'-azido – 3' deoksitimidin) pretvori v AZTMP (3'-azido-3' deoksitimidin mono fosfat). Količina AZT, ki se pretvori v AZTMP je merjena količina timidin kinaze, ki je v vzorcu.

50 $\mu$ L vzorca inkubiramo z 100 $\mu$ L pufra 1, 20 $\mu$ L pufra 2 in 20 $\mu$ L poliklonskih protiteles anti-AZTMP, ki so prevlečena z magnetnimi delci. Po 40 minutni inkubaciji dodamo 100 $\mu$ L označevalca in AZTMP, to je dodani analogni konjugat. Med prvo inkubacijo se AZTMP veže na trdni nosilec. Po drugi inkubaciji označevalec tekmuje za vezavno mesto na AZTMP v raztopini. Po 20 minutni inkubaciji se nevezan material spere s ciklom spiranja. Ob dodatku startnega reagenta poteče reakcija kemiluminescence. Sprosti se svetloba, ki se meri z luminometrom v relativnih svetlobnih enotah (Relative Light Units-RLU) in je premosorazmerna koncentraciji timidin kinaze (19).

### 3.1.2 Materiali

#### Reagenti

Magnetni delci (2.4 mL)	Magnetni delci z kunčjimi in kozjimi protitelesi, pufer, 0,1% BSA, 0,09% natrijev azid, pH=7,4
Konjugat (12mL)	Derivat izoluminola in pufer, 0.2% BSA, 0.09% NaN <sup>3</sup> pH=7,4
Pufer 1 (12mL)	Pufer, pH=7,4 z kofaktorji, kunčji ter kozji IgGs
Pufer 2 (2.5mL)	Pufer, pH=4,5
Število poskusov	100

Kalibrator 1 (liofiliziran)	človeški serum, 0,09% NaN <sub>3</sub> in TK rekonstruira v 1mL destilirane ali deionizirane vode.
Kalibrator 2 (liofiliziran)	človeški serum, 0,09% NaN <sub>3</sub> in TK rekonstruira v 1mL destilirane ali deionizirane vode.

### 3.1.3. Postopek testa

Da zagotovimo pravilno delovanje testa moramo strogo upoštevati navodila za obratovanje z LIAISON® analizatorjem. Parameter vsakega testa je opredeljen s črtno kodo na Reagent Integralu. V primeru da bralnik črtnih kod ne deluje pravilno se lahko ustrezni podatki vnesejo ročno.

Operacije analizatorja so naslednje:

1. pipetiranje 50µL vzorca, kalibratorja, ali kontrole v reakcijski modul
2. pipetiranje Pufra 1, Pufra 2, in magnetnih delcev v reakcijski modul
3. 40 minutna inkubacija
4. spiranje z Wash/System raztopino
5. dodatek začetnega reagenta in meritev sevane svetlobe (19).

### **3.1.4. Kalibracija aparature**

Kalibracijo izvajamo:

- pri vsaki novi uporabi reagentov v intervalu,
- vsakih sedem dni,
- po vsakem servisiranju LIAISON analizatorja,
- če so vrednosti kontrole kakovosti izven dovoljenih območij (19).

#### Meritveno območje

Analizator LIAISON proizvajalca DiaSorin meri vsebnost timidin kinaze med 0,5 in 100 E/L (19).

### **3.1.5 Opis metode**

Merjenje temelji na principu kemiluminiscence:

Kemiluminiscenca je emisija svetlobe, ki se sprosti ob kemijski reakciji pri normalni temperaturi. Kemiluminiscenčne metode so kompetitivne, pri njih je antigen zaznamovan z luminolom. Pri imunokemični reakciji antigena s protitelesi dodamo reagent, ki vsebuje vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) in encim peroksidazo. Z dodajanjem peroksidaze spravimo luminol v vzbujeno stanje. Peroksidaza  $H_2O_2$  pretvori v  $H_2O$  in povzroči oksidacijo luminola. Prek intermedijatorjev prehaja luminol v osnovno stanje, sprostijo se fotoni in oddaja se luminiscenca. V reakciji se sprošča svetlobna energija, ki jo merimo pri 425nm (13).

### **3.1.6 Kontrola kakovosti**

Kontrolo kakovosti je priporočljivo izvesti enkrat na dan uporabe aparature. LIAISON Timidin kinaza kontrolni set je dobro opremljen glede na zahteve kontrole kakovosti. Kontrola mora biti vključena na koncu vsakega naslednjega nosilca z vzorcem ali še pogosteje.

Kadar je kontrola izven zahtevanega območja, je ponovno potrebno izvesti kalibracijo in kontrolni test (19).



**Slika 2:** Analizator Liaison Diasorin

### **3.2 $\beta$ 2-MIKROGLOBULIN**

Koncentracijo  $\beta$  2-mikroglobulina smo določali v serumu. Analiza se je izvajala na LIAISON<sup>®</sup> analizatorju z LIAISON<sup>®</sup>  $\beta$ 2- microglobulin reagenti.

#### **3.2.1 Princip metode**

Metoda za kvantitativno določanje  $\beta$  2-mikroglobulina temelji na kemiluminescenci. Poliklonalna protitelesa (kunjca) se vežejo na trden nosilec (magnetni delci). Med inkubacijo se B2MG odcepi od vezavne beljakovine in tekmuje za vezavno mesto na protitelesu označeno z B2MG. Po inkubaciji se nevezan material odstrani z spiranjem.

Pozneje, od dodatku začetnega reagenta poteče reakcija, pri kateri nastane konjugat izoluminol-protitelo, sprosti se svetloba, ki se izmeri z luminometrom v relativnih svetlobnih enotah (Relative Light Units- RLU) (18).

### 3.2.2 Materiali

2,3 mL	Suspencija z magnetnimi delci
1,0 mL	Kalibrator, nizek
1,0 mL	Kalibrator, visok
8,0 mL	Redčilo
22,0 mL	Raztopina sledilnega konjugata

Visoka stopnja hemolize in lipemije in visoke koncentracije bilirubina lahko vplivajo na določitev koncentracije analita.

### 3.2.3 Princip testa

Dosledno spoštovanje pravil zagotavlja pravilno izvedbo testa. Parameter vsakega testa je opredeljen s pomočjo črtne kode na etiketi reagenta. V primeru da bralnik črtnih kod ne deluje pravilno se lahko ustrezni podatki vnesejo ročno (18).

Operacije analizatorja so naslednje:

10 $\mu$ L	vzorec, kalibrator ali kontrola
+20 $\mu$ L	magnetni delci
+200 $\mu$ L	raztopina sledilnega konjugata
10min	inkubacija, ki mu sledi spiranje
3 s	merjenje

### 3.2.4 Opis metode

Merjenje temelji na principu kemiluminiscence:

Kemiluminiscenca je emisija svetlobe, ki se sprosti ob kemijski reakciji pri normalni temperaturi. Kemiluminiscenčne metode so kompetitivne, pri njih je antigen zaznamovan z luminolom. Pri imunokemični reakciji antigena s protitelesi dodamo reagent, ki vsebuje vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) in encim peroksidazo. Z dodajanjem peroksidaze spravimo luminol v vzbujeno stanje. Peroksidaza  $H_2O_2$  pretvori v  $H_2O$  in povzroči oksidacijo luminola. Prek intermedijatorjev prehaja luminol v osnovno stanje, sprostijo se fotoni in oddaja se luminiscenca. V reakciji se sprošča svetlobna energija, ki jo merimo pri 425nm (13).

### **3.2.5 Kalibracija aparature**

Kalibracijo izvajamo:

- pri vsaki novi uporabi reagentov v intervalu,
- vsakih sedem dni,
- po vsakem servisiranju LIAISON analizatorja,
- če so vrednosti kontrole kakovosti izven dovoljenih območij (13).

#### Meritveno območje

Analizator LIAISON proizvajalca DiaSorin meri vsebnost B2MG med 0,12 in 40 mg/L (13).

### **3.2.6 Kontrola kakovosti**

Kontrolo kakovosti je priporočljivo izvesti enkrat na dan uporabe aparature. LIAISON Beta 2 mikroglobulin kontrolni set je dobro opremljen glede na zahteve kontrole kakovosti. Kontrola mora biti vključena na koncu vsakega naslednjega nosilca z vzorcem ali še pogosteje.

Kadar je kontrola izven zahtevanega območja, je ponovno potrebno izvesti kalibracijo in kontrolni test (13).



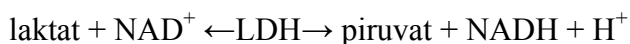
### 3.3 LAKTAT DEHIDROGENAZA (LDH)

#### 3.3.1 Princip metode

Merjenje koncentracije LDH v serumu se je izvajala na analizatorju Roche Hitachi 917 kot rutinski laboratorijski postopek. Analizator Hitachi 917 je v celoti računalniško avtomatiziran analizator. Namenjen je za kvantitativno ali kvalitativno in vitro določanje analitov v krvi in drugih telesnih tekočinah. Analizator je sestavljen iz analitične in nadzorne enote. Analitična enota vključuje ISE in fotometrične merilne sisteme.

LDH katalizira v prisotnosti NADH redukcijo piruvata v laktat, pri čemer se ekvivalentna količina NADH oksidira v  $\text{NAD}^+$  (21).

- LDH je prenašalec vodika prek koencima  $\text{NAD}^+$ .
- Reakcija je reverzibilna, smer reakcije je odvisna od pH



#### 3.3.2 Reagenti

R1	TRIS pufer	50 mmol/L
	L-laktat	5 mmol/L
R2	$\text{NAD}^+$	7.0 mmol/L

#### 3.3.3 Opis metode

Princip merjenja temelji na absorpcijski spektrometriji. Pri spektroskopiji se del elektromagnetnega valovanja z uklonom razdeli na valovne dolžine. Z absorpcijsko spektrometrijo merimo koncentracijo snovi. Princip temelji na merjenju absorpcije svetlobe v vzorcu pri določeni valovni dolžini in jo primerjamo z absorpcijo svetlobe znane standardne raztopine, merjene pri enaki valovni dolžini (21).

Za absorpcijsko spektrometrijo velja Beerov zakon, ki pravi da je koncentracija raztopine pri konstantni dolžini poti svetlobe (širine kivete), konstantni valovni dolžini in temperaturi direktno proporcionalna količini absorbirane svetlobe.

$$\log \frac{I_o(\lambda)}{I(\lambda)} = A = k \cdot b \cdot c$$

kjer je  $I_o$  jakost svetlobe vpadnega žarka,  $I$  jakost svetlobe po prehodu skozi snov,  $A$  je absorbanca (ekstinkcija),  $k$  molarni absorpcijski (ekstinkcijski) koeficient,  $b$  dolžina svetlobne poti skozi snov in  $c$  koncentracija določane zvrsti. Molarni absorpcijski koeficient je značilen za zvrst, ki absorbira svetlobo in se spreminja z valovno dolžino (21).



**Slika 3:** Analizator Roche Hitachi 917

## 4. REZULTATI

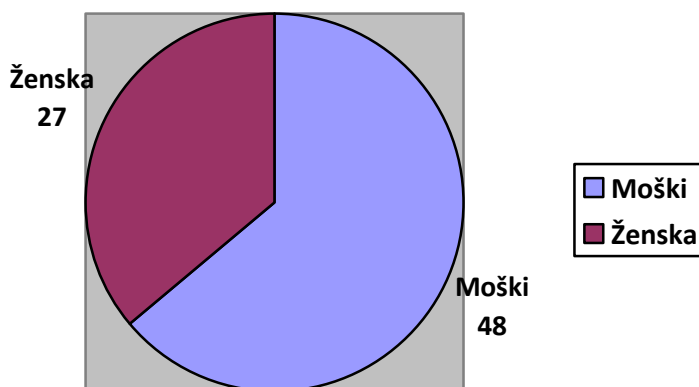
### 4.1 VZORCI

Skupno smo analizirali 75 vzorcev, med katerim je bilo 48 (64%) moških in 27 (36%) žensk. Povprečna starost odvzetih bolnikov je 68,4. Najmlajši preiskovanec je bil star 48 let, najstarejši pa 88 let.



Slika 4: Število bolnikov po posameznih starostnih skupinah

Slika 5: Število preiskovancev glede na spol:



**4.2 PREGLEDNICE IZMERJENIH KONCENTRACIJ VZORCEV****Preglednica I:** Rezultati vzorcev v remisiji

Št. vzorca	Spol	Datum odvzema	Datum rojstva	TK	LDH	$\beta$ -2-MG
1	Ž	23.01.	1.10.1933	30,3	3,07	3,48
2	M	23.01.	29.7.1949	45,7	2,75	3,69
3	M	29.01.	9.2.1932	28,7	2,03	4,24
4	Ž	29.01.	1.11.1930	3,7	2,64	1,56
5	M	30.01.	16.6.1937	7,1	2,59	3,88
6	Ž	30.01.	14.4.1949	9	2,16	2,07
7	M	01.02.	3.4.1926	31,1	2,64	5,31
8	M	05.02.	7.12.1956	1,1	1,93	1,46
9	Ž	05.02.	8.12.1926	3,9	2,28	2,46
10	M	06.02.	28.3.1943	23,1	2,96	2,85
11	M	07.02.	13.9.1929	8,4	1,8	1,73
12	M	07.02.	4.9.1943	9,5	2,48	1,55
13	M	07.02.	25.9.1936	5,3	2,04	4,92
14	M	07.02.	15.12.1950	1,3	2	1,29
15	Ž	12.02.	16.4.1937	27,5	4,07	5,9
16	Ž	13.02.	18.9.1946	15,4	2,7	4,11
17	M	14.02.	5.2.1943	3,5	2,21	2,6
18	Ž	21.02.	3.8.1938	111	2,03	2,09
19	M	21.02.	18.3.1937	11,2	3,96	1,1
20	M	21.02.	21.11.1948	12,8	0,76	1,46
21	M	23.02.	15.1.1950	52,7	2,64	2,55
22	Ž	26.02.	13.6.1957	14	2,58	1,37
23	M	27.02.	6.4.1933	5	2,24	2,71
24	M	28.02.	20.5.1939	101	1,94	1,36
25	M	28.02.	17.1.1954	13,5	2,06	1,38
26	Ž	29.02.	15.8.1942	37,8	2,49	1,83
27	M	29.02.	30.5.1921	6,5	1,31	4,28
28	M	04.03.	9.2.1952	16,7	1,71	2,39
29	M	06.03.	10.10.1925	20,1	2,55	4,84
30	Ž	06.03.	11.4.1952	6,4	2,8	1,66
31	M	06.03.	29.3.1944	1,4	0,96	2,25
32	Ž	06.03.	17.8.1950	30,1	0,8	1,68
33	M	06.03.	9.3.1929	8,9	1,79	1,88
34	M	11.03.	13.1.1927	81,1	2,82	2,12
35	Ž	11.03.	3.9.1936	85,9	2,2	2,88
36	M	11.03.	24.5.1953	9,7	0,67	1,86
37	Ž	11.03.	3.11.1928	4,6	1,63	2,52
38	Ž	11.03.	24.6.1951	8,2	2,62	2,98
39	M	12.03.	11.8.1933	3,4	2,95	2,2
40	Ž	13.03.	9.2.1931	101	6,51	6,95
41	M	13.03.	9.5.1937	1,5	2,04	3,3
42	M	13.03.	23.1.1936	15,2	0,68	3,69

Št. vzorca	Spol	Datum odvzema	Datum rojstva	TK	LDH	β-2-MG
43	M	13.03.	20.12.1936	16,5	2,58	7,23
44	Ž	13.03.	9.1.1934	3,5	0,46	1,98
45	M	18.03.	15.12.1932	22,4	0,78	3,65
46	M	18.03.	11.10.1949	12,7	1,06	1,38
47	M	18.03.	9.2.1936	10,2	0,63	2,56
48	M	19.03.	5.11.1938	6,3	0,45	1,68
49	M	19.03.	23.7.1955	23,7	0,96	3,12
50	M	20.03.	3.5.1943	61,8	1,27	2,42
51	M	20.03.	1.11.1953	3,2	0,5	1,29
52	M	20.03.	12.8.1941	3,6	0,52	1,79
53	Ž	25.03.	5.4.1953	5,3	2,43	1,45
54	Ž	25.03.	17.10.1938	16,3	3,5	3,75
55	Ž	25.03.	24.8.1932	7,4	2,83	1,86
56	M	27.03.	26.1.1954	24,9	3,55	3,17
57	M	27.03.	5.3.1961	39,3	1,92	3,42
58	M	27.03.	8.6.1938	37,2	4,13	4,41
59	M	01.04.	20.8.1930	2,4	2,08	1,43
60	Ž	03.04.	19.12.1938	3,7	1,31	1,62
61	Ž	03.04.	17.2.1960	2,4	0,74	1,26
62	Ž	03.04.	17.5.1930	3,7	0,61	6,96
63	Ž	09.04.	20.10.1948	8,5	0,69	1,46

Preglednica II: Rezultati vzorcev v relapsu

Št. vzorca	Spol	Datum odvzema	Datum rojstva	TK	LDH	β-2-MG
1	M	23.01.	9.11.1942	17,7	6,39	5,51
2	M	23.01.	15.10.1932	6,8	1,79	4,61
3	M	29.01.	23.9.1937	121	5,42	4,58
4	Ž	29.01.	8.10.1943	22,8	3,5	2,99
5	M	01.02.	19.11.1935	48,7	3,66	2,2
6	Ž	28.02.	2.3.1929	48,8	3,96	3,42
7	Ž	29.02.	21.6.1927	11,3	1,3	3,29
8	M	13.03.	17.11.1948	16,6	0,66	3,51
9	M	18.03.	7.12.1956	1,5	2,2	1,71
10	M	01.04.	2.10.1940	14,7	2,81	4,08
11	M	01.04.	13.4.1950	2,5	2,42	1,19
12	Ž	01.04.	28.1.1932	8,5	1,07	3,44

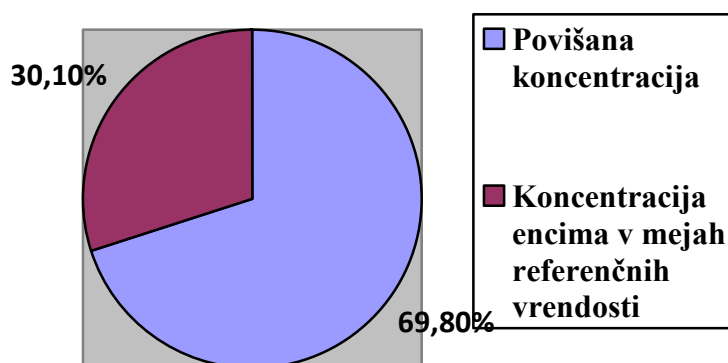
## 4.2. REMISIJA

### 4.2.1. Rezultati določanja koncentracije timidin kinaze

Referenčna vrednost za koncentracijo timidin kinaze v serumu je do 6,1E/L.

Izmed 63 odvzetih vzorcev, ki so v remisiji ima zvečano koncentracijo timidin kinaze 44 (69,8%) vzorcev, 19 (30,1%) vzorcev pa je bilo v območju referentne vrednosti.

Slika 6: Delež zvečane koncentracije timidin kinaze pri remisiji



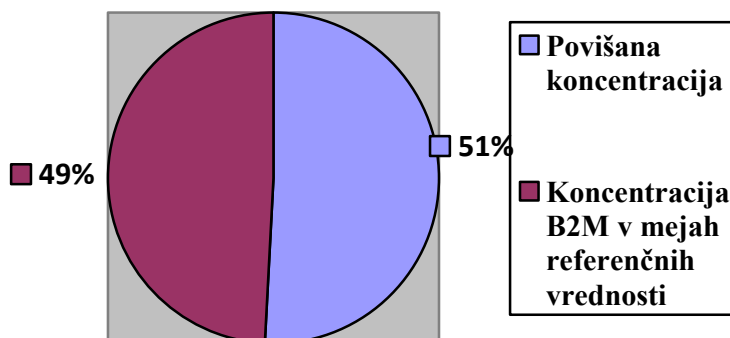
#### 4.2.2 Rezultati določanja koncentracije $\beta$ -2 mikroglobulina

Referenčne vrednosti za koncentracijo  $\beta$ -2 mikroglobulina v serumu so:

- za moške: 0,60-2,29 mg/L
- za ženske: 0,61-2,45 mg/L

Zvečano koncentracijo B2MG smo v stanju remisije izmerili pri 32 (50,8%) preiskovancih od 63 vzorcov. Pri 31 (49,2%) vzorcih je koncentracija B2MG v mejah referentne vrednosti.

Slika 8: Delež zvečane koncentracije B2MG v remisiji



#### 4.2.3. Rezultati določanja LDH

Referenčne vrednosti koncentracije LDH v serumu so:

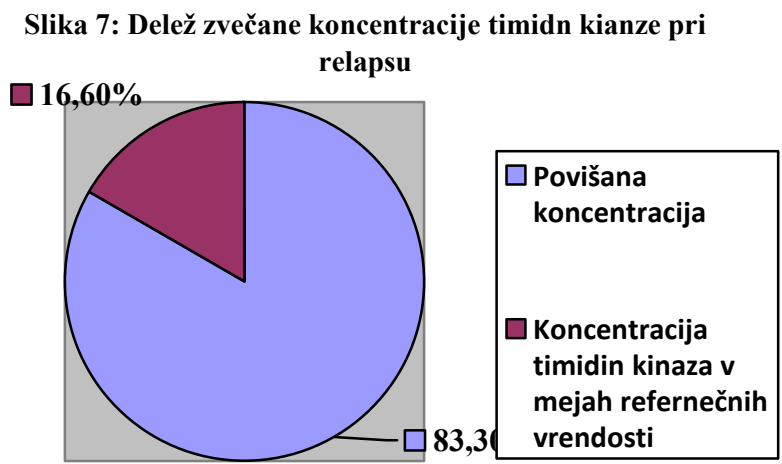
- moški: do 4,12  $\mu$ kat/L
- ženske: do 4,13  $\mu$ kat/L

V remisiji imajo vsi preiskovanci koncentracijo LDH v serumu v mejah referentne vrednosti (100%).

### 4.3 RELAPS

#### 4.3.1. Rezultati določanja koncentracije timidin kinaze

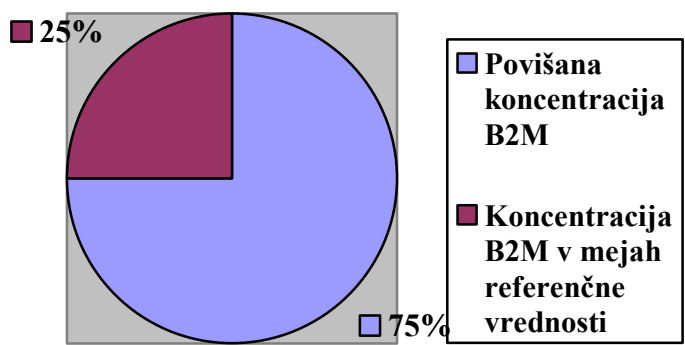
Izmed 12 odvzetih vzorcev, ki so v relapsu ima zvečano koncentracijo timidin kinaze 10 (83,3%) vzorcev, 2 (16,6%) vzorca pa sta v območju referentne vrednosti.



#### 4.3.2. Rezultati določanja koncentracije $\beta$ -2 mikroglobulina

Zvečano koncentracijo B2MG v relapsu ima 9 (75%) vzorcev od skupno 12 vzorcev. Ostali 3 (25%) vzorci so v območju referentne vrednosti.

**Slika 9: Delež zvečane koncentracije B2MG v relapsu**

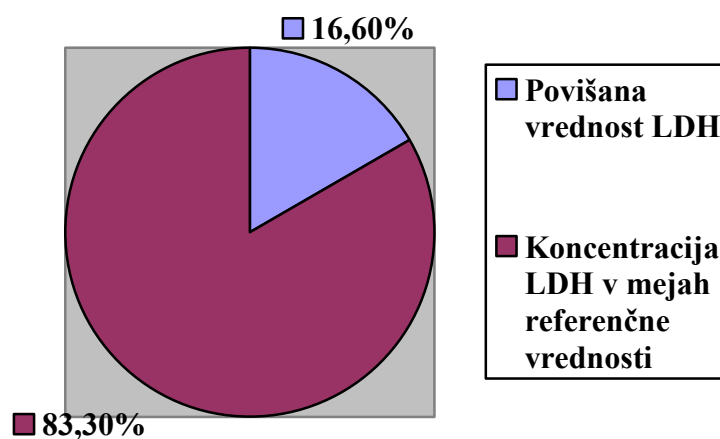




### 4.3.3. Rezultati določanja LDH

Zvečano koncentracijo LDH v relapsu smo izmerili pri 2 (16,6%) vzorcih od skupno 12 (83,3%) vzorcev. Oba preiskovanca sta moškega spola (100%)

**Slika 11: Delež zvečane koncentracije LDH v relapsu**



**Tabela 2:** Število vzorcev, aritmetična sredina in standardna deviacija vzorcev v remisiji

	TK	LDH		β-2-MG	
		moški	ženske	moški	ženske
N	<b>63</b>	<b>40</b>	<b>23</b>	<b>40</b>	<b>23</b>
M	<b>21,1</b>	<b>2,76</b>	<b>2,78</b>	<b>1,923</b>	<b>2,31</b>
SD	<b>26,00</b>	<b>1,37</b>	<b>1,71</b>	<b>0,95</b>	<b>1,33</b>

**Tabela 3:** Število vzorcev, aritmetična sredina in standardna deviacija vzorcev v relapsu

	TK	LDH		β-2-MG	
		moški	ženske	moški	ženske
N	<b>12</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>4</b>
M	<b>26,7</b>	<b>3,4</b>	<b>3,29</b>	<b>3,2</b>	<b>2,5</b>
SD	<b>33,56</b>	<b>1,56</b>	<b>0,21</b>	<b>1,91</b>	<b>1,48</b>

**Tabela 4:** Rezultati t testa za primerjanje vzorca z referenčnimi vrednosti

		<i>t</i>	<i>df</i>	<i>p</i>	
<b>TK</b>	<b>REMISIJA</b>	4,580	62	0,000	
	<b>RELAPS</b>	2,130	11	0,057	
<b>B2MG</b>	<b>REMISIJA</b>				
		moški	-2,438	39	0,019
		ženske	-0,501	22	0,621
	<b>RELAPS</b>				
		moški	1,302	7	0,234
		ženske	0,010	3	0,993
<b>LDH</b>	<b>REMISIJA</b>				
		moški	-6,279	39	0,000
		ženske	-3,789	22	0,001
	<b>RELAPS</b>				
		moški	-1,265	7	0,246
		ženske	-8,140	3	0,004

S t testom za primerjanje vzorca z referenčno vrednostjo smo preverili razlike v koncentraciji med posameznimi encimi ter pripadajočo referenčno vrednostjo.

V stanju remisije smo ugotovili, da je koncentracija timidin kinaze statistično pomembno višja kot referenčna vrednost za koncentracijo tega encima. Koncentracija  $\beta$ -2 mikroglobulina in LDH pa je pri moških in ženskah v remisiji statistično pomembno nižja kot referenčna vrednost za koncentracijo teh dveh encimov.

Koncentracija timidin kinaze v relapsu ni statistično pomembno višja kot referenčna vrednost za koncentracijo tega encima. Koncentracija  $\beta$ -2 mikroglobulina pa se pri moških

in ženskah v relapsu statistično pomembno ne razlikuje od referenčne vrednosti za koncentracijo tega encima v serumu.

Ugotovili smo tudi, da se koncentracija LDH pri moških v relapsu statistično pomembno ne razlikuje, medtem ko je koncentracija LDH pri ženskah statistično pomembno nižja kot referenčna vrednost za koncentracijo tega encima v serumu.

## 4.3. IZRAČUNI KORELACIJ

### 4.3.1 Remisija

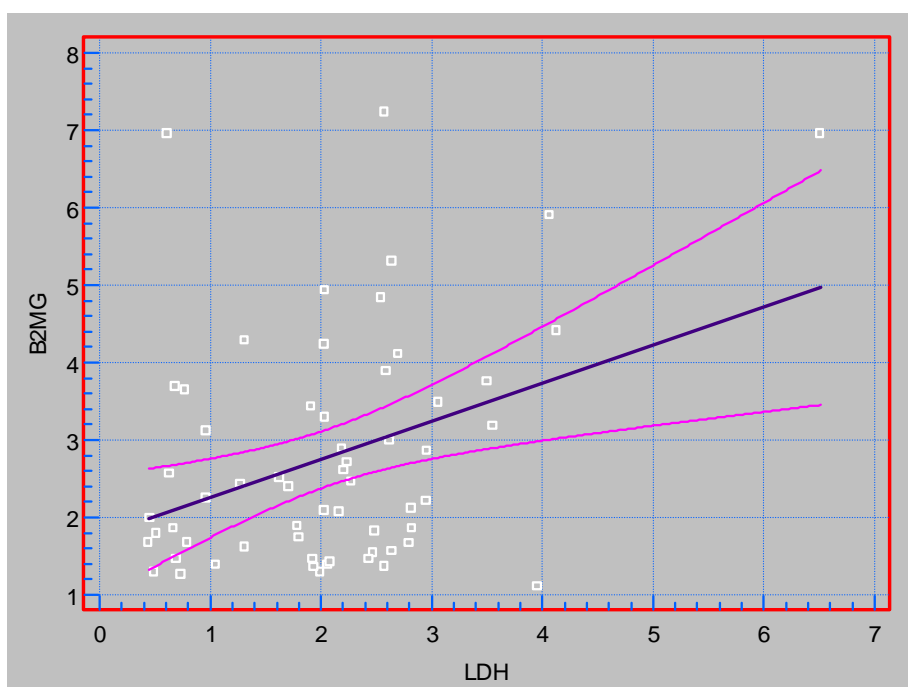
#### 4.3.1.1. Spremenljivka Y : B2MG

Spremenljivka X : LDH

Število vzorcev = 63

Koeficient korelacije  $r = 0,3647$   $P=0,0042$

95% interval zaupanja za  $r = 0,1220$  do  $0,5662$



**Slika 12:** Korelacijska premica B2MG v odvisnosti od LDH

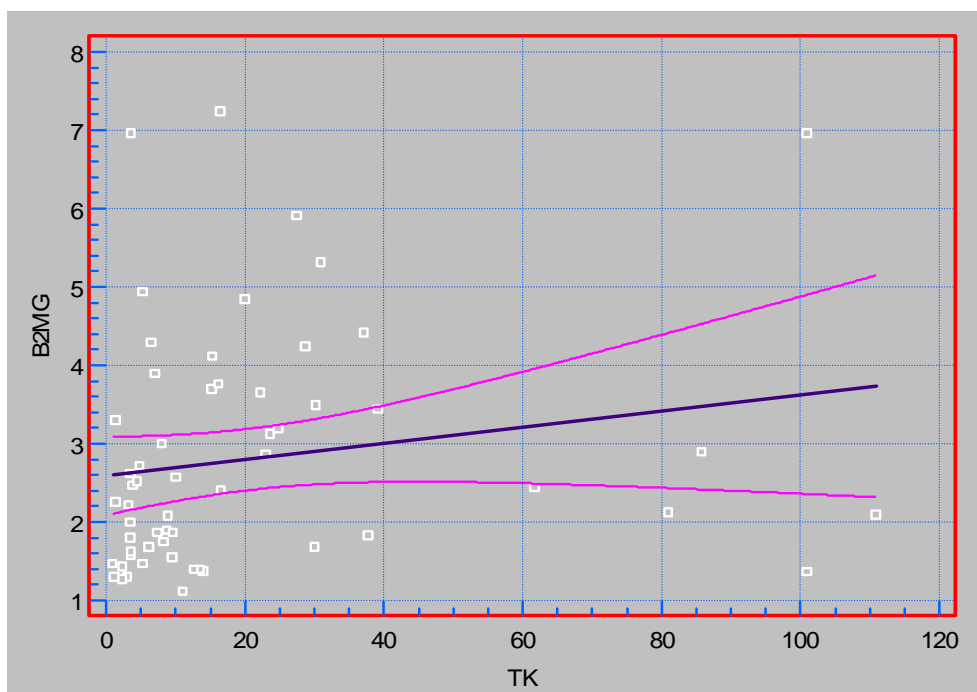
#### 4.3.1.2 Spremenljivka Y : B2MG

Spremenljivka X : TK

Število vzorcev= 63

Koeficient korelacije  $r = 0,1790$   $P=0,1749$

95% interval zaupanja za  $r = -0,0808$  do  $0,4160$



**Slika 13:** Korelacijska premica B2MG v odvisnosti od TK

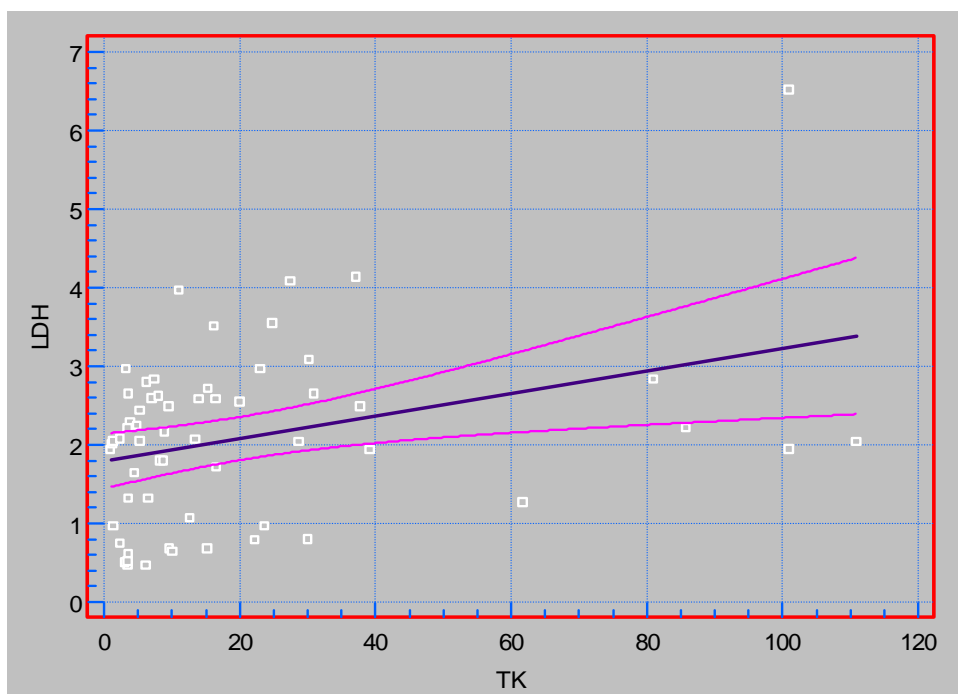
#### 4.3.1.3 Spremenljivka Y : LDH

Spremenljivka X : TK

Število vzorcev= 63

Korelacijski koeficient  $r = 0,3385$   $P=0,0087$

95% interval zaupanja za  $r = 0,0902$  do  $0,5471$



**Slika 14:** Korelacijska premica LDH v odvisnosti od TK

### 4.3.2 Relaps

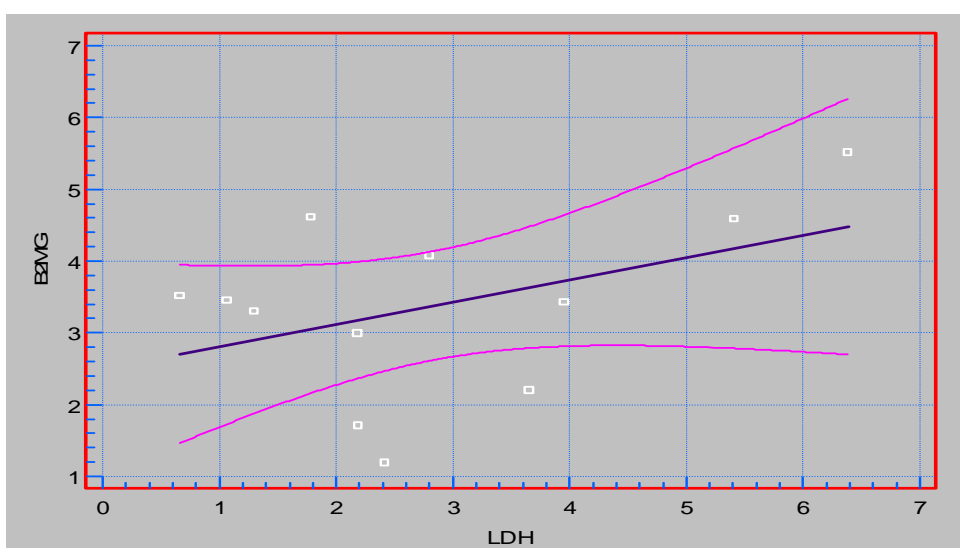
#### 4.3.2.1 Spremenljivka Y : B2MG

Spremenljivka X : LDH

Število vzorcev = 12

Korelacijski koeficient  $r = 0,4342$   $P=0,1584$

95% interval zaupanja za  $r = -0,1860$  do  $0,8070$



**Slika 18:** Korelacijska premica B2MG v odvisnosti od LDH



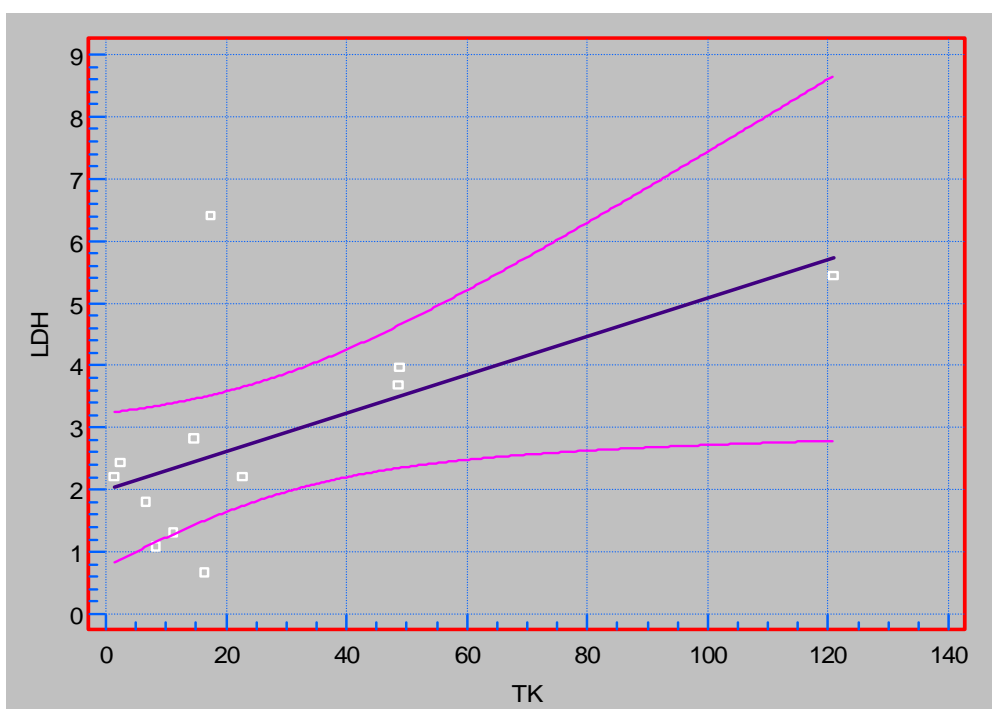
#### 4.3.2.2. Spremenljivka Y : LDH

Spremenljivka X : TK

Število vzorcev = 12

Korelacijski koeficient  $r = 0,5927$   $P=0,0423$

95% interval zaupanja za  $r = 0,0285$  do  $0,8705$



**Slika 19:** Korelacijska premica LDH v odvisnosti od TK

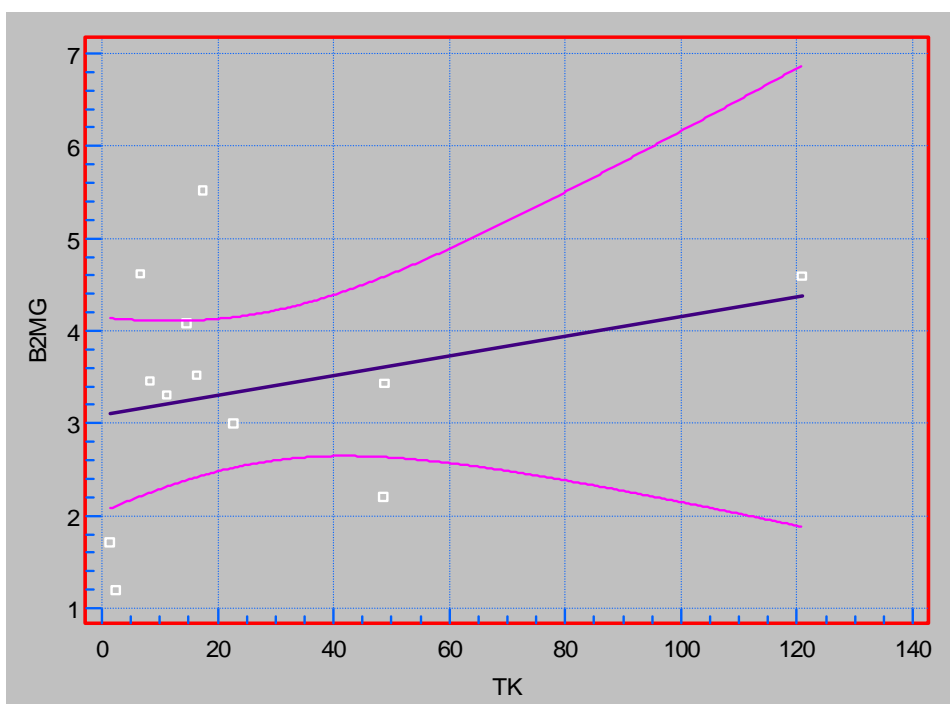
#### 4.3.2.3. Spremenljivka Y : B2MG

Spremenljivka X : TK

Število vzorcev = 12

Korelacijski koeficient  $r = 0,2856$   $P=0,3682$

95% interval zaupanja za  $r = -0,3448$  do  $0,7385$



**Slika 20:** Korelacijska premica B2MG v odvisnosti od TK

## 5. RAZPRAVA

Določanje tumorskih označevalcev za spremljanje dinamike malignih bolezni je danes uveljavljena in marsikdaj nenadomestljiva onkološka laboratorijska metoda. Tumorski označevalci so zanesljivi predvsem pri spremljanju odgovora na zdravljenje, ter pri zgodnjem odkrivanju ponovitve bolezni.

Raziskave so pokazale da se koncentracija timidin kinaze (TK) v serumu lahko uporabi za oceno prognoze pri bolnikih z limfoproliferativnimi boleznimi in diseminiranim plazmocitomom in nekaterih Ne-Hodgkinovih limfomih. Pri bolnikih s kronično limfatično levkemijo (KLL) je koncentracija timidin kinaze pri določitvi prognoze neodvisna od drugih prognostičnih dejavnikov, vendar je še vedno nejasno, ali se lahko uporablja za napovedovanje odziva na zdravljenje in za čas preživetja (16).

V raziskavi so želeli ugotoviti ali se vrednost TK lahko uporabi za napovedovanje odziva na zdravljenje in čas preživetja. V ta namen so naknadno preučili serumsko koncentracijo TK v 188 predhodno nezdravljenih in zdravljenjih bolnikih z aktivno ali napredno KLL. Vrednost TK je bila zvečana pri 92% bolnikih in izkazalo se je da je raven TK povezana z prejšnjim zdravljenjem, stopnjo bolezni in z drugimi tumor spremljajočimi dejavniki (število limfocitov, beta 2 mikroglobulin in laktat dehidrogenaza) (17).

Prišli so do zaključka, da serumska koncentracija TK pri bolnikih s kronično limfatično levkemijo zagotavlja koristne prognostične informacije tudi v zvezi z odzivom na zdravljenje in čas preživetja in to je potrebno upoštevati pri načrtovanju ustreznega zdravljenja. To velja zlasti pri bolnikih z vrednostjo 10 E/L in več, ki imajo slabo prognozo in jih je treba vključiti v intenzivno zdravljenje (17).

V naši raziskavi smo ugotovili v remisiji zvečano koncentracijo timidin kinaze pri 68,3% bolnikih in zvečano koncentracijo B2MG pri 53% bolnikih, ter koncentracijo LDH v mejah referentne vrednosti. V stanju relapsa pa smo izmerili zvečano koncentracijo TK pri 83,3% bolnikih, LDH pri 16,6% bolnikih, ter B2MG pri 75% bolnikih. Glede na to, da predstavlja povečanje TK večji delež v fazi relapsa kot v fazi remisije, lahko iz tega

sklepamo, da je TK dober prognostični označevalec. Povišane vrednosti v času remisije, bi lahko bolje komentirali, če bi imeli več podatkov za posameznega bolnika. Takrat bi vedeli ali obstaja trend padanja vrednosti, kar bi kazalo na to, da je terapija uspešna. V primerih porasta vrednosti pa bi to kazalo, da terapija ni uspešna in da lahko pride do relapsa.

Izračuni korelacijskih koeficientov med posameznimi parametri so pri bolnikih v remisiji pod 0,4 kar pove, da rezultati med seboj niso odvisni in da torej lahko tako kot TK kot B2MG samostojno služita kot neodvisna tumorska označevalca.

Korelacijski koeficienti so v fazi relapsa nekoliko višji (do 0,6) kar pomeni, da se organizem ob ponovnem izbruhu bolezni odzove s povišanjem obeh parametrov.

Ker je povišanje LDH v naši skupini bolnikov izredno majhen (16,6%) lahko ugotovimo, da LDH ni parameter, ki bi ga lahko uporabili kot napovedni dejavnik za relaps.

Z izračuni korelacij smo torej ugotovili, da ti parametri med seboj niso povezani. Kot vzrok je lahko, da smo imeli nehomogeno skupino preiskovancev, premajhno število preiskovancev in da so bili v raziskavo vključeni naključni preiskovanci. Da bi dosegli večjo specifičnost bi lahko kombinirali več tumorskih označevalcev. Za lažjo interpretacijo rezultatov bi bilo tudi potrebno določiti več tumorskih označevalcev v različnih stadijih bolezni ter spremljati gibanje njihovih koncentracij.

Pri pregledu in raziskavi rezultatov smo ugotovili da izmed odvzetih vzorcev prevladuje moški spol, saj je delež moških preiskovancev 64% in da v povprečju zbolijo relativno starejši preiskovanci. Povprečna starost odvzetih pacientov je 68,4, kar je tudi skladno s podatki v literaturi (22).

Ne smemo pa izključiti biološke dejavnike, ki lahko vplivajo na serumske koncentracije tumorskih označevalcev. Glede na to, da idealnega tumorskega označevalca ni in da snovi, ki jih uporabljamo kot tumorske označevalce, ne nastajajo samo in izključno kot spremljevalci malignega procesa obstaja nekaj dejavnikov, ki lahko vplivajo na serumske koncentracije tumorskih označevalcev (8).

Zato moramo pri vrednotenju rezultatov imeti v mislih, da levkemija ni edini vzrok za povečane vrednosti tumorskih označevalcev. V večjih koncentracijah se lahko tvorijo tudi pri nekaterih nerakavih procesih (različna vnetja, bolezni jeter) ter različnih fiziološki stanjih. Iz tega lahko sklepamo, da tudi pri naši raziskavi obstaja možnost lažno negativnih in lažno pozitivnih rezultatov.

Kemiluminiscenčna metoda ima v primerjavi s trenutno uporabljeno metodo prednost v tem, da ni radioaktivna in zato niso potrebne posebne zahteve pri delu z izotopom in od tod tudi sledi, da je cenejša. Čas analize je krajši, kajti pri RIA metodi traja postopek analize 2 dni, medtem ko pri LIA metodi 2 uri. Metoda na LIAISONU je popolnoma avtomatizirana in zato tudi obstaja manjša verjetnost napak.

## **6. SKLEP**

Skupni delež vseh zvečanih serumskih koncentracij smo odkrili pri 81,3% preiskovancih. Serumske koncentracije tumorskih označevalcev si med seboj statistično niso povezane.

Statistično nepovezanost tumorskih označevalcev pripisujemo temu, da bolnike nismo obravnavali pred zdravljenjem.

Na serumsko koncentracijo tumorskih označevalcev vplivajo še drugi dejavniki, ki niso povezani z novotvorbo.

Kemiluminiscenčna metoda za določanje TK in B2MG je v primerjavi z RIA metodo uporabnejša, ker daje primerljive rezultate, analiza traja manj časa in je delo manj zdravju škodljivo, ker se izognemo radioaktivnosti.

## LITERATURA

1. Kocjančič Andreja, Mravlje Franc: Interna medicina, DZS, Ljubljana 1993; 996-1005
2. Fras Albret Peter: Onkologija, Ljubljana, Didakta, 1994; 322-337
3. Malin Dollinger: Življenje z rakom, odkrivanje, zdravljenje, Ljubljana, Tehniška založba Slovenije, 1995; 89-93, 304-319
4. Boyer Rodney, Temelji biokemije, Ljubljana, Študentska založba, 2005; 210
5. Osredkar Joško: Izbrana poglavja iz klinične kemije, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2008; 92-106
6. Osredkar Joško: Izbrana poglavja iz klinične kemije, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2008; 299-302
7. Osredkar Joško: Izbrana poglavja iz klinične kemije, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2008; 322
8. [http://www.onko-i.si/sl/za\\_javnost\\_in\\_bolnike/osnovna\\_dejstva\\_o\\_raku/tipi\\_raka/](http://www.onko-i.si/sl/za_javnost_in_bolnike/osnovna_dejstva_o_raku/tipi_raka/) 10.2.2009; 11:00
9. Novaković S. Tumorski označevalci v klinični onkologiji. Onkološki inštitut, 2000; 8-14
10. [http://www.onkologija.org/sl/domov/o\\_raku/maligni\\_limfomi/](http://www.onkologija.org/sl/domov/o_raku/maligni_limfomi/) 13.2.2009; 14:00

11. Andoljšek Dušan, Černelč Peter, Mlakar Uroš, Modic Mojca, Pajič Tadej, Podgornik Helena, Preložnik Zupan Irena, Pretnar Jože, Zver Samo: Bolezni krvi in krvotvornih organov, 68-74
12. [http://en.wikipedia.org/wiki/Thymidine\\_kinase](http://en.wikipedia.org/wiki/Thymidine_kinase) 15.2.2009; 21:30
13. [http://en.wikipedia.org/wiki/Beta-2\\_microglobulin](http://en.wikipedia.org/wiki/Beta-2_microglobulin) 15.2.2009; 21:30
14. Jesenovec Niko: Izbrani postopci analiza u kliničko – biokemijskim laboratorijima, Ognjen prica, Karlovac, 1990; 199-205
15. Cerar Anton, Luzar Boštjan, Rott Tomaž, Zidar Nina: Patologija, Katedra za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, Ljubljana 2006; 135-139
16. [http://annonc.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/12/5/621?ijkey=dd10df1df0ce0925f65dd4f5c057c1249ebf2b75&keytype2=tf\\_ipsecsha](http://annonc.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/12/5/621?ijkey=dd10df1df0ce0925f65dd4f5c057c1249ebf2b75&keytype2=tf_ipsecsha) 17.3.2009, 19:30
17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11432619?dopt=Abstract> 20.3.2009, 20:00
18. DiaSorin LIAISON<sup>®</sup>  $\beta$  Microglobulin (REF 314501), Instructions.
19. DiaSorin LIAISON<sup>®</sup> Thymidine kinase (310960) Instructions.
20. Boyer Rodney, Temelji biokemije, Ljubljana, Študentska založba, 2005; 204-205
21. [http://en.wikipedia.org/wiki/Lactate\\_dehydrogenase](http://en.wikipedia.org/wiki/Lactate_dehydrogenase) 14.2.2009, 14:00



22. <http://maxilla.mf.uni-lj.si/files/onko/limfsem.rtf>, 14.3.2009, 16:30
  
23. Incidenca raka v Sloveniji 2005, Register raka za Slovenijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana 2008; 77