

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA KUKOVEC

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI PROGRAM LABORATORIJSKE
BIOMEDICINE

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA KUKOVEC

**POMEN DOLOČANJA TUMORSKEGA
OZNAČEVALCA CYFRA 21-1 PRI RAKU SEČNEGA
MEHURJA**

**THE SIGNIFICANCE OF DEFINING THE TUMOUR
MARKER CYFRA 21-1 FOR BLADDER CANCER**

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI PROGRAM
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo.

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju za pomoč in vodenje pri opravljanju diplomskega dela.

Prav tako se zahvaljujem izr. prof. dr. Samu Kreftu in doc. dr. Janezu Ilašu za njune koristne napotke po pregledu diplomske naloge.

Še posebej se zahvaljujem staršema, ki sta mi omogočila študij in mi vedno stala ob strani. Prav tako se zahvaljujem sestri Doroteji in fantu Borutu za njuno neizčrpno podporo v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala po vodstvu mentorja prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm.

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Samo Kreft, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Janez Ilaš, mag. farm.

Kazalo

1. UVOD	1
1.1. Splošno o sečilih	1
1.2. Bolezni sečil	3
1.2.1. Vnetje	3
1.2.2. Sečni kamni.....	3
1.2.3. Akutna ledvična odpoved	4
1.2.4. Kronična ledvična odpoved	5
1.2.5. Dializa	5
1.2.6. Presaditev ali transplantacija	5
1.2.7. Ciste	6
1.2.8. Poškodbe	6
1.2.9. Uhajanje seča	7
1.2.10. Prirojene nepravilnosti sečil	7
1.3. Rak sečnega mehurja.....	8
1.3.1. Splošno o raku	8
1.3.2. Rak sečnega mehurja.....	10
2. DIAGNOSTIKA RAKA SEČNEGA MEHURJA	13
2.1. Vrste najpomembnejših diagnostičnih preiskav	13
2.1.1. Ultrazvok.....	13
2.1.2. Preiskave seča	13
2.1.3. Krvne preiskave	14
2.2. Tumorski označevalci	14
2.2.1. Vloga in lastnosti tumorskih označevalcev.....	14
2.2.2. Delitev tumorskih označevalcev.....	19
2.2.2.1. Onkofetalni proteini.....	20
2.2.2.2. Hormoni	21
2.2.2.3. Encimi.....	22
2.2.2.4. Tumor spremljajoči antigeni	22
2.2.2.5. Posebni serumski proteini.....	25
2.2.2.6. Skupina različnih tumorskih označevalcev.....	26
2.3. Tumorski označevalec Cyfra 21-1	27
2.3.1. Raziskava o kliničnem pomenu Cyfre 21-1 v primerjavi z ustaljenimi tumorskimi označevalci	27

2.3.2. Raziskava o vlogi Cyfre 21-1 kot tumorskega označevalca pri raku sečnega mehurja.....	32
2.3.3. Raziskava o uporabnosti Cyfre 21-1 za spremljanje uspešnosti zdravljenja pacientov z rakom sečnega mehurja	32
2.4. Metode določanja tumorskih označevalcev.....	33
2.4.1. Radioimunski testi (RIA)	33
2.4.2. Encimsko imunske tehnike (EIT).....	34
2.4.3. Luminiscenčne imunološke metode.....	34
3. NAMEN DELA.....	35
4. EKSPERIMENTALNI DEL.....	36
4.1. Definicija skupine	36
4.2. Natančen opis metode	36
4.2.1. Princip metode Cyfra 21-1 EIT	36
4.2.2. Reagenti.....	37
4.2.3. Priprava reagentov	38
4.2.4. Zbiranje vzorcev in ravnanje z njimi	39
4.2.5. Material	39
4.2.6. Postopek Cyfra 21-1 EIT.....	40
5. REZULTATI.....	42
5.1. Izračun občutljivosti in specifičnosti Cyfre 21-1	43
5.2. Primerjava korelacije z diagnozo pri določanju Cyfre 21-1, pri cistoskopiji in citologiji	44
5.3. Število obolelih za rakom sečnega mehurja glede na spol.....	44
5.4. Starost pacientov obolelih za rakom sečnega mehurja	45
6. RAZPRAVA.....	46
7. SKLEP	49
8. LITERATURA	50

POVZETEK

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, kakšen je klinični pomen določanja tumorskega označevalca Cyfra 21-1 pri raku sečnega mehurja. V ta namen smo statistično ovrednotili rezultate izmerjenih koncentracij Cyfre 21-1 v serumu 15 pacientov starih od 38 do 80 let, za katere smo sumili, da imajo raka na sečnem mehurju.

V diplomski nalogi smo vrednosti koncentracij Cyfre 21-1 dobili z meritvami opravljenimi na ELISA analizatorju Personal Lab na urološki kliniki v Kliničnem centru, Zaloška cesta 7, Ljubljana.

Na podlagi statistične obdelave zbranih podatkov smo ugotovili, da je Cyfra 21-1 s 50-odstotno občutljivostjo in 100-odstotno specifičnostjo dokaj dober tumorski označevalec za raka sečnega mehurja. V naši preiskovani skupini 15 pacientov jih je bilo 11, ki jim je bil rak sečnega mehurja predhodno kirurško odstranjen in so bili na nadaljnji terapiji, ter 4, ki jim rak mehurja še ni bil odstranjen. Dva sta imela napreduvalno obliko raka, dva pa raka v začetnem stadiju. Vrednost Cyfre 21-1 je bila pri pacientih z napreduvalno obliko raka sečnega mehurja močno povišana, pri drugih dveh z rakom v začetnem stadiju pa normalna. Na podlagi teh rezultatov smo prišli do ugotovitve, da je Cyfra 21-1 klinično pomembna le pri pacientih z napreduvalno obliko raka sečnega mehurja, pri tistih z rakom v začetnem stadiju pa ne. Iz dobljenih rezultatov je bilo razvidno tudi to, da ima Cyfra 21-1 zelo pomembno vlogo pri spremljanju uspešnosti terapije. Vrednosti Cyfre 21-1 so bile pri vseh 11 pacientih, ki so bili na terapiji in niso imeli raka, normalne.

ABSTRACT

The purpose of this thesis was to determine the clinical meaning of defining the tumour marker Cyfra 21-1 for bladder cancer. For this purpose the results of the measured concentrations of Cyfra 21-1 in the serum of 15 patients between the ages of 38 and 80 years were statistically evaluated; these patients were assumed to have bladder cancer.

In the thesis the concentration values of Cyfra 21-1 were gathered with measurements done on the ELISA analyzer Personal Lab at the urology clinic in the Clinical centre (Zaloška Street 7, Ljubljana).

On the basis of the statistical analysis of the gathered information, Cyfra 21-1 with 50% sensitivity and 100% specificities proved to be a rather good tumour marker for bladder cancer. Among all the patients in the research group there were 11 of those, who were in therapy and 4 of those, who had bladder cancer. Two patients had an advanced stage of bladder cancer and two had cancer in the early stage. The value of Cyfra 21-1 was highly elevated with the patients with the advanced stage of cancer, while it was normal with the other two patients with cancer in the early stage. On the basis of these results a conclusion was made that Cyfra 21-1 is clinically important only for patients with the advanced stage of bladder cancer, but not for patients with cancer in the early stage. It is also visible from these results that Cyfra 21-1 is highly important when it comes to monitoring the efficiency of the therapy. The values of Cyfra 21-1 were normal with all eleven patients, who were in therapy and did not have bladder cancer.

1. UVOD

1.1. Splošno o sečilih

Ljudje vsakodnevno vnašamo v telo različne snovi. Te snovi prehajajo v celice, ki s svojim delovanjem iz njih proizvajajo koristne in škodljive produkte. Koristne lahko telo ponovno uporabi, zato le-te ostanejo v njem, škodljive oziroma nepotrebne snovi pa izloči (1). Poznamo štiri načine izločanja škodljivih snovi. Prvo je izdihovanje, s katerim izločamo npr. ogljikov dioksid. Drugo je izločanje blata, s katerim izločamo npr. žolčna barvila, ki nastanejo pri razgradnji hemoglobina. Tretje je potenje, s katerim prav tako izločamo odpadne snovi. In najpomembnejši, četrti način izločanja je uriniranje (2). Naloga sečil kot najpomembnejšega organa za izločanje je izločanje odvečnih snovi iz telesa, kot so na primer končni produkti presnove beljakovin (sečnina, kreatinin) in izločanje telesu tujih snovi (zdravil, strupov). Druga naloga je uravnavanje vode in elektrolitov v telesu, saj iz telesa odstranjujejo ali zadržujejo vodo. Vzdržujejo kislinsko-bazično ravnovesje v krvi in imajo še endokrine funkcije. Tvorijo renin, eritropoetin, aktivne oblike vitamina D in prostaglandine (3). Renin sodeluje pri uravnavanju krvnega tlaka, eritropoetin pa spodbuja tvorbo eritocitov (4).

Najpomembnejši del sečil sta ledvici, saj s prečiščevanjem krvi proizvajata seč in tako odstranjujeta škodljive snovi iz telesa (1). Pri nastanku seča sodelujejo trije mehanizmi. Prvi je glomerularna filtracija, drugi je delna resorpcija glomerularnega filtrata iz volumna tubulov in tretji je tubulna sekrecija v seč (3). Vsi trije mehanizmi potekajo v osnovnih strukturnih in funkcionalnih enotah ledvic, ki se imenujejo nefroni. V vsaki ledvici jih je približno milijon. Sestavljeni so iz ledvičnih telesc (glomerulus ali Malpighijevo telesce) in ledvičnih cevčic (tubulus), ki se združujejo v večje funkcionalne enote. Ledvične cevčice so zgrajene iz treh delov: proksimalni zviti tubul, Henleyjeva zanka in distalni zviti tubul. Ledvično telesce sestavlja klobčič kapilar, ki ga kot prazna in uveznjena žoga ovija bowmanova ovojnica (kapsula). Njen notranji list se prilega klobčiču kapilar, zunanji list pa se nadaljuje v ledvično cevčico. Kri iz drobne dovodne arteriole se filtrira v kapilarnem klobčiču ledvičnega telesca, nato pa odteka po odvodni arterioli. Iz filtrirane krvi prehajajo voda in škodljive snovi skozi steno kapilar in notranjega lista bowmanove ovojnice v proksimalno zviti tubul, ki izstopa iz ledvičnega telesca (1). S filtracijo krvi skozi ledvična telesca dobimo primarni seč. Skozi ledvice teče vsako minuto okoli 1,2 litra krvi, tako da dnevno nastane približno 180 litrov

primarnega seča. Od tega se skozi proksimalne zvite tubule ter Henleyjeve zanke ponovno resorbira nazaj približno 150 litrov, skozi distalne zvite tubule pa še dodatnih 28,5 litrov vode. Tako pri prehodu primarnega seča skozi različne dele tubulov nastane končni seč, ki ga dnevno izločimo okoli 1,5 litra (3). Kot je bilo že prej omenjeno, se seč tvori v ledvicah. Ledvici sta parni organ fižolaste oblike in temno rdeče barve, ki v dolžino merita okrog 12 centimetrov (1). Ležita v trebušni votlini pod trebušno prepono zadaj ob hrbtenici. Desna ledvica leži nekoliko nižje od leve, ker jo odriwa desni jetrni reženj. Zgornjemu delu ledvice se prilega nadledvična žleza, ki nima funkcionalne zveze z ledvico (4). Ledvico od zunaj obdaja vezivna ovojnica, v notranjosti pa se nahajata ledvična skorja in sredica. Ledvična telesca se nahajajo v ledvični skorji, ki je obrobni sloj ledvice. Eno ledvično telesce je veliko le od 1 do 3 desetinke milimetra in je vidno kot zrno v ledvični skorji. Zaradi tega ima ledvična skorja videz drobno zrnate strukture. Pod skorjo se nahaja ledvična sredica, ki je rdečkaste barve in je sestavljena iz 10 do 15 piramid. Vzдолž piramide potekajo proksimalne zvite ledvične cevčice, ki se nadaljujejo naprej v Henleyjevo zanko, te pa v distalne zvite cevčice, ki se zlivajo v zbiralce. Več zbiralc se nato združijo na vrhu piramid. Piramidni vrhovi so obrnjeni proti ledvičnemu mehu, ki se podaljšuje v ledvične čašice. V čašicah se zbira seč, ki priteka iz odprtanic piramid. Ledvični meh se navzven nadaljuje v sečevod. Sečevoda sta začetek sečnih izvodil, ki povezujeta ledvici s sečnim mehurjem. Pri odraslem merita 25 do 30 centimetrov. Steno sečevoda sestavljajo zunanja plast, mišična plast in sluznična plast. Zunanja plast veže sečevod z okolico, mišična plast pa s krčenjem potiska seč v sečni mehur. Sečni mehur je votel organ, katerega stena dovoljuje kopičenje od 300 do 350 mililitrov seča. Ima podobno sestavo kot sečevod, le da je stena debelejša. Odtekanje seča iz sečnega mehurja preprečujeta notranja in zunanja mišica zapiralka. Notranja zapiralka se sprosti pod vplivom raztegnjene stene polnega mehurja, zunanja zapiralka pa pod vplivom naše volje. Pri tem se mišičje v steni mehurja skrči in seč steče po sečnici na prosto (1). Sečnica je izvodilo, ki se začne z notranjim ustjem sečnice v mehurju in se v predvoru nožnice oziroma na glavici spolnega uda odpira na prostost z zunanjim ustjem sečnice. Zgrajena je iz enakih treh plasti kot sečevod in sečni mehur. Ženska in moška sečnica se razlikujeta. Ženska sečnica je dolga 3 do 4 centimetre in je anatomsko ločena od spolnih organov. Moška sečnica pa meri približno 20 centimetrov in poteka skozi prostato in spolni ud (4).

1.2. Bolezni sečil

Prav tako kot vse druge organe lahko tudi sečila prizadenejo različne bolezni. Pogosteje se pojavljajo vnetja, sečni kamni, akutna in kronična odpoved ledvic, tumorji, ciste, poškodbe, uhajanje seča ter prirojene nepravilnosti.

1.2.1. Vnetje

Do vnetja sečil pride zaradi prodora bakterij skozi sečnico. Najpogostejši povzročitelji so gram negativne bakterije kot so *Escherichia coli*, *Enterokok*, *Pseudomonas*, *Proteus* in *Klebsiella*. Vnetje se pogosteje pojavlja pri ženskah zaradi krajše sečnice. Vnetja sečil delimo na vnetja spodnjih in vnetja zgornjih sečil. Gnojno vnetje ledvičnega parenhima se imenuje akutni pielonefritis. Najpogosteje nastane zaradi širjenja vnetja iz mehurja, pri sečnih kamnih in po kateterizaciji. Prvi znaki vnetja so pogostejša in boleča mikcija, kasneje sledita še visoka vročina in mrzlica. Bolnik navaja tope bolečine v ledvenem predelu, slabo počutje, slabost in bruhanje. Bolniku odvzamemo seč ter pregledamo usedlino seča. V usedlini je vidno veliko število levkocitov ter veliko bakterij, zaradi tega je potrebno narediti urinokulturo. Bolniku predpišemo kemoterapevtik, ki ga po dobljenih izvidih urinokulture lahko tudi zamenjamo. Če akutnega pielonefritisa ne zdravimo, lahko pride do nastanka kroničnega pielonefritisa. Drugi možni vzroki za nastanek kroničnega pielonefritisa so še kamni v ledvici, prirojene anomalije ali pa se razvije počasi brez jasnega akutnega začetka. Pri tej bolezni pride do nastanka brazgotin v ledvici in do propada ledvičnega tkiva. Konča se z majhno skrčeno ledvico, kronično ledvično odpovedjo in z zvišanim tlakom. Znaki kroničnega pielonefritisa velikokrat niso značilni. Bolnik se dlje časa slabo počuti, utrujen je, ima glavobol in visok krvni tlak. V usedlini seča so vidni levkociti, eritrociti in bakterije. Zdravimo ga s kemoterapevtiki.

1.2.2. Sečni kamni

Sečni kamni nastanejo zaradi obarjanja normalnih sestavin seča, kot so mineralne soli in organske snovi. Zaradi kamnov bolehalo približno 2-3 odstotki prebivalstva. Moški zbolijo trikrat pogosteje kot ženske. Pri 30 do 50 odstotkih se kamni ponovijo. Vzroki za nastanek ledvičnih kamnov so majhne količine koncentriranega seča, spremenjen pH, zastoj seča in vnetje. Približno 60 odstotkov kamnov je iz kalcijevega oksalata, približno 30 odstotkov kamnov pa iz trifosfata (vnetni kamni) in organskih kamnov iz sečne kisline in cistina je

približno 10 odstotkov. Pri ledvičnih kamnih prihaja do urolitiaz. Najpogostejši znak je ledvični napad. Zanj so značilne neznosne bolečine, ki trajajo po nekaj minut. Bolnik je nemiren, prizadet, ne najde položaja, v katerem bi ostal, običajno tudi bruha. Kamni v ledvicah so lahko različnih velikosti. Če je kamen večji od 1 centimetra, ga je treba odstraniti, saj ni pričakovati, da se bo sam izločil. Danes kamne do velikosti 3 centimetre drobimo zunaj telesa. Za to se uporablja več različnih drobnikov. Pri tem nastane pesek, ki se z uriniranjem izloči v nekaj tednih. Če je kamen večji od 3 centimetrov, ga zdrobimo endoskopsko ali operiramo. Kamni v sečevodu do velikosti 4 milimetre se izločijo sami, večje od 5 milimetrov pa moramo odstraniti ureterorenoskopsko, jih zdrobiti zunaj telesa ali jih odstraniti z operacijo. Kamni se prav tako lahko pojavijo v mehurju in se ne razlikujejo od kamnov drugod v sečilih. Kamen v mehurju raste, saj mu povečana prostata, zožitev pod mehurjem ali motnja v praznjenju preprečujejo, da bi se izločil. Najpogostejši znak kamna v mehurju je pogosta mikcija. Kamen zdrobimo ali ga odstranimo z odprto operacijo. Pogost zaplet pri kamnih so vnetja ali ledvični zastoji.

1.2.3. Akutna ledvična odpoved

Do akutne ledvične odpovedi (ALO) pride zaradi slabe prekrvavitve. Ledvica ne dobi dovolj kisika in hranljivih snovi, zato se okvari ledvična funkcija. Vzroki za nastanek ALO so večje krvavitve, motnje delovanja srca, velike izgube tekočine pri opeklinah, driskah, septičnem šoku in pri hudih vnetjih. ALO poteka v več različnih fazah. Začne se z oligourijo, preide v anurijo in se nadaljuje v poliurijo ter v obdobje rekonvalescence. Zmanjšana proizvodnja seča, t.i. oligourija, je ponavadi prvi znak ALO. Posledica oligourije je zvišanje kreatinina v serumu in nastanek metabolne acidoze. V tej fazi je treba previdno nadomeščati izgubljeno tekočino, redno meriti elektrolite in uravnavati acidozo. Oligurični fazi sledi anurija, to je nezmožnost izločanja seča. Bolnik izloči manj kot 100 mililitrov seča na dan. Anurija se nadaljuje v poliurijo. V tej fazi pride do prekomerne tvorbe seča in normalizacije ledvične filtracije. Seč je razredčen, saj ni reabsorbcije filtrata. Počasi se začne vračati tubularna funkcija, količina seča se zmanjša in ledvici ponovno izločata koncentriran seč. Če oligurične faze ni mogoče prevesti v poliurično, je treba začeti z dializo.

1.2.4. Kronična ledvična odpoved

Poleg akutne ledvične odpovedi poznamo tudi kronično ledvično odpoved (KLO). KLO je posledica zmanjšane števila nefronov. Ledvice nimajo sposobnosti odstranjevanja produktov presnove iz telesa in ohranjati ravnotežja med elektroliti in tekočino. Najpomembnejši bolezenski znaki KLO so porast kreatinina, acidoza in anemija. Bolnik je oslabel, nima apetita, hujša, slabo mu je in bruha. Omejiti mora uživanje proteinov. Tako zdravljenje lahko traja več let, preden pride do končne faze te bolezni, ko sta potrebni dializa in transplantacija (5).

1.2.5. Dializa

Dializa je postopek, s katerim iz telesa odstranjujemo razpadle produkte presnove ter uravnavamo ravnotežje med elektroliti in tekočino. Poznamo hemodializo in peritonealno dializo. Hemodializa je najbolj razširjena metoda zdravljenja pri KLO in ALO. Nadomešča izločevalno funkcijo ledvic, vzdržuje ravnovesje vode, elektrolitov in uravnava acido-bazično ravnovesje. Z njo odstranjujemo nepotrebne in dodajamo želene snovi. Pri hemodializi se v dializatorju izmenjujejo snovi med krvjo in dializno raztopino s pomočjo difuzije in ultrafiltracije. Z difuzijo prehajajo snovi, kot je na primer sečnina, iz krvnega dela v dializno raztopino, kalcij in bikarbonat pa iz dializne raztopine v kri. Pri peritonealni dializi uporabljamo peritonej (trebušna mrena), ki deluje kot polprepustna biološka membrana. Skozi njo poteka menjava topljencev in vode med kapilarno peritonealno krvjo in peritonealno dializno raztopino (6). V trebušno votlino vnesemo skozi kateter tekočino s posebno sestavo in jo tam pustimo približno eno uro. Kri se očisti preko trebušne mreže zaradi njenih lastnosti. Uporablja se jo kot začasno metodo. Po operacijah v trebuhu ali pri vnetnih procesih je ne moremo opravljati.

1.2.6. Presaditev ali transplantacija

Presaditev ali transplantacija ledvic je edini način zdravljenja pri ljudeh v zadnji fazi kronične ledvične odpovedi. Kandidati za presaditev so bolniki s KLO stari do 65. leta starosti, ki nimajo maligne bolezni oziroma nobene bolezni, ki bi lahko povzročila zaplete. Prejemnikovo in dajalčevo tkivo se mora ujemati, zato je potrebno narediti tipizacijo tkiva. Ledvico lahko podari živi dajalec ali mrtva oseba, ki je umrla zaradi možganske kapi. Ko ledvico odstranijo iz dajalčevega telesa, jo prepojijo s posebno tekočino in jo prejemniku presadijo v medenico.

Po opravljeni presaditvi je potrebno prejemnika redno spremljati zaradi možnih kirurških zapletov ali zaradi zavrnitve organa.

1.2.7. Ciste

Ciste v ledvicah ponavadi odkrijemo naključno z ultrazvokom. Ponavadi je cista majhna in ne kaže bolezenskih znakov. V primeru velike ciste bolnik čuti bolečine v ledvenem predelu in lahko ima krvav seč. Tako cisto punktiramo pod ultrazvočno kontrolo ali jo kirurško odstranimo. Policistična bolezen je običajno družinska bolezen in je prirojena. Ledvica se s časom cela zapolni z večjim številom različno velikih cist. Ciste pritiskajo na okolno zdravo tkivo in ga s tem uničujejo. Bolezen lahko prizadene tudi jetra in pljuča. Tak bolnik mora omejiti vnos beljakovin, soli in kalija. Pri napredovali bolezni se razvije KLO in potrebna je dializa ter na koncu transplantacija.

1.2.8. Poškodbe

Poškodbe so lahko odprte ali zaprte. Najhujša poškodba je odtrgana ledvica. Pri takšni poškodbi se pojavljajo znaki hemoragičnega šoka (tahikardija in hipotenzija). Poznamo še odprte poškodbe ledvice in udarnine ali raztrganine ledvičnega tkiva. Pri teh poškodbah nastane urohematom, ki je lahko omejen na ledvico ali se širi v njeno okolico. Pri poškodbah ledvenega predela bolnik čuti topo naraščajočo bolečino in izloča krvav seč. Če čuti bolečine v ramenu, je to znak za draženje trebušne prepone zaradi urohematoma. Poškodovance moramo skrbno opazovati, saj lahko pride do šoka ali znakov, ki kažejo na poškodbo drugih organov. V tem primeru je potrebna operacija. Poškodbe mehurja in sečnice obsegajo skupaj več kot 20 odstotkov vseh poškodb sečil in spolovil. Polni mehur lahko počí v zgornjem delu pri močnem udarcu v spodnji del trebuha in seč se pomeša s krvjo ter se izlije v trebušno votlino. V tem primeru je raztrganina mehurja ponavadi intraperitonealna. Bolnik čuti bolečino v spodnjem delu trebuha, je napet, ima znake peritonealnega draženja, odsotnosti peristaltike in znake proste tekočine ter ne izloča seča. Pri intraperitonealni raztrganini je potrebno odpreti trebušno votlino, zašiti raztrganino ter vstaviti kateter. Pri ekstraperitonealni raztrganini se seč izlije v prostor ob mehurju. Bolnik čuti pritisk na mehur od znotraj, ker urohematom pritiska na mehur in ga sili na uriniranje. Pri ekstraperitonealni raztrganini je običajno dovolj drenirati prostor ob mehurju in vstaviti kateter. Do poškodbe sečnice prihaja v zadnjih časih vse pogosteje zaradi velikega števila prometnih nesreč in poškodb pri raznih športih. Pri poškodbah sečnice ločimo udarnino ter delno ali popolno raztrganino. Znaki so

krvavitev iz sečnice, bolečina v presredku ali nad sramnico. Uriniranje je lahko oteženo ali nastane popolna zapora. Zdravnik pri pregledu opazi vidno oteklino in podplutbo v presredku ali mošnji. Pri poškodbah sečnice bolnika ne smemo katetizirati, saj lahko pride do vnetja sečnice ali se sečnica pretrga. Zdravljenje je kirurško (5).

1.2.9. Uhajanje seča

Urinska inkontinenca ali uhajanje seča je stanje, ki spravlja v zadrego in neprijetnosti. Gre za neprijeten higienski in socialni problem za bolnika. Pogosteje se pojavlja pri ženskah kot pri moških in to v vseh starostih. Seč zaradi različnih vzrokov uhaja skozi sečnico ali skozi katero drugo odprtino. Možni vzroki so porod, okužbe, debelost, sladkorna bolezen, ginekološke operacije v medenični votlini, tumorji, ledvični kamni, upad estrogena v menopavzi in tako naprej. Nekaterim inkontinenca predstavlja bolj nadlogo kot resno težavo. V tem primeru pomagajo vaje za nadzorovanje odtekanja seča. V drugem primeru pa inkontinenca predstavlja resno težavo, zaradi katere je potrebna kirurška pomoč. Poznamo različne vrste inkontinence, do katerih pride zaradi različnih vzrokov.

Pri *stresni inkontinenci* nenadzorovano uhaja majhna količina seča vsakič, ko karkoli povzroča pritisk na mehur (kašljanje, kihanje ali smejanje). Ta vrsta inkontinence je najpogostejša oblika in je posledica šibkosti mišic medeničnega dna. Pri *urgentni inkontinenci* zaradi nehotenega krčenja mišic sečnega mehurja uhajajo velike količine seča. Kadar bolnica nima nadzora nad mehurjem zaradi okvare živčevja, govorimo o *refleksni inkontinenci*. Pri *prelivni inkontinenci* imajo bolnice ves čas občutek polnega mehurja. V tem primeru se seč vrača po sečevodih nazaj v ledvice in s seboj lahko nosi hudo okužbo. Pri *funkcijski inkontinenci* bolnice lahko nadzorujejo odtekanje seča, vendar zaradi telesne okvare ne morejo priti pravočasno do stranišča. Ta vrsta inkontinence je zelo pogosta v starosti. Zadnja vrsta je *prehodna inkontinenca*, ki je samo začasna nevšečnost. Mine, ko izgine vzrok, zaradi katerega je nastala. Zdravljenje je odvisno od vrste inkontinence. Možna je ginekološka fizioterapija, hormonsko nadomestno zdravljenje, operacija in razna zdravila (7).

1.2.10. Prirojene nepravilnosti sečil

Med prirojene nepravilnosti ledvic uvrščamo odsotnost ene ali obeh ledvic ter podkvaste ledvice. Kadar je ena ledvica odsotna ali manjša, je druga ponavadi večja. Če se odločimo za odstranitev takšne ledvice, moramo predhodno oceniti velikost in delovanje druge ledvice. Ledvice lahko ležijo na neobičajnem mestu, v tem primeru govorimo o ektopiji ledvice. Pri

podkvastih ledvicah sta spodnja pola obeh ledvic zaraščena. Zaradi tega sta zasukani v vzdolžni osi in sečevoda tečeta pred ledvico. Takšne ledvice so pogosto vnete in vsebujejo kamne. Poznamo tudi prirojene nepravilnosti sečevodov. Podvojena sečevoda lahko potekata posamično in tako vstopita v mehur ali pa se na poti združita. Pri podvojenih sečevodih sta lahko podvojena tudi ledvična meha. »Ureterokela je prirojena razširitev dela sečevoda v steni mehurja z močno zoženim ustjem. Ektopičen sečevod se odpira v sečnici pod zapiralnim sistemom (v sečnico, nožnico). Bolnik je zato inkontinenten. Sečevod je treba na novo vstaviti v mehur. Vsaka nepravilnost lahko povzroči zaplete.« (cit. po Miksić in Flis, 2003, str.236)

Ena najhujših prirojelih nepravilnosti mehurja je ekstrofija. Mehur je zaradi napake v razvoju sprednje trebušne stene in sprednje stene mehurja navzven odprt. Stena mehurja je vidna in iz sečevoda teče seč. Ta nepravilnost se pogosteje pojavlja pri dečkih kot pri deklicah. Zdravljenje je operativno in poteka v več fazah. Druga nepravilnost sečnega mehurja je divertikel. Lahko je prirojen ali pridobljen. Vzroki za prirojeni divertikel niso povsem znani, vendar predvidevajo, da gre za razvojno napako dela stene mehurja. Pridobljeni divertikel nastane pri slabosti mišične stene mehurja zaradi ovire pod mehurjem (povečana prostata, zožena sečnica). Pri tej nepravilnosti pride pogosto zaradi slabega praznjenja mehurja do nastanka kamnov in vnetja. Majhnih divertiklov, ki ne povzročajo težav, ni potrebno zdraviti, večje pa operiramo. K prirojenim nepravilnostim sečnice spadajo epispadija in hipospadija. Pri epispadiji se vrh sečnice odpira na zgornji strani penisa, pri hipospadiji pa se odpira na spodnji strani penisa niže od normalnega mesta na vrhu glansa. Vzrok za obe nepravilnosti je nepravilen embrionalni razvoj. Zdravljenje je kirurško (5).

1.3. Rak sečnega mehurja

1.3.1. Splošno o raku

Tumor ali rak je splošno ime za veliko skupino različnih bolezni. Njihova glavna značilnost je nenadzorovano deljenje spremenjenih, rakastih celic. Človeško telo je zgrajeno iz ogromnega števila različnih tipov celic. Celice rastejo in se delijo le takrat, ko organizem to potrebuje. Ker je življenjska doba večine celic omejena, je celična delitev, s katero nastajajo nove celice, nujna za obnavljanje tkiv in za ohranitev zdravega organizma. V vsaki celici se nahaja po 23 kromosomov. Skozi vsak par se zvija molekula DNK, ki je nadzornik in prenašalec dednih lastnosti v kromosomih. V njih je na milijone genov, ki naročajo telesu, kako naj raste, deluje

in se vede. Z vsako delitvijo celic se podvajajo tudi kromosomi, zato je veliko možnosti, da pride do napake oziroma mutacije (8). Vzroki za mutacije genov so različni. Pri 80 odstotkih rakov ne poznamo vzroka za njihov nastanek. Lahko je kriva starost, prehranjevanje, kajenje, debelost, dolgotrajna izpostavljenost kemičnim snovem ali visokim odmerkom sevanja, nekateri virusi in sistemske bolezni. Preostalih 20 odstotkov rakov je dednih. Okvarjen gen, ki je kriv za nastanek neke vrste raka, se prenaša s staršev na otroke. Pri njih je tveganje za nastanek te vrste raka večje kot pri tistih, ki nimajo podedovanega tega gena (9). Okvarjen gen začne pošiljati napačno oziroma drugačno sporočilo, kot bi moral, zato začne celica hitro rasti. Ko se rast rakaste celice enkrat začne, se nikoli več ne neha nenadzorovano deliti. Nastane rak ali tumor. Rakaste celice se delijo z različnimi hitrostmi. Temu času pravimo podvojitveni čas. Hitro rastoče vrste raka se lahko podvojijo v 1 do 4 tednih, počasi rastoče vrste pa v 2 do 6 mesecih. Rak se lahko pojavi v katerem koli delu telesa in pri vseh starostih. Najpogostejši pa je pri starejših od 50 let. Ločimo *benigne* in *maligne* vrste raka. Benigne vrste so zgrajeni iz celic, ki so podobne normalnim in imajo omejeno sposobnost rasti. Veliko ljudi jih ima. To so pege, materina znamenja in maščobne kepe v koži, ki ne povzročajo nobenih težav razen včasih estetskih. Lahko jih operiramo ali jih pustimo pri miru. Če jih odstranimo z operacijo, se praviloma ne ponovijo. Benigne vrste rakov ne ogrožajo življenja, saj se ne razraščajo v druge dele telesa, zato jih ne štejemo med rakaste tvorbe. Maligne vrste rakov pa so rakaste tvorbe, zgrajene iz nenormalnih celic. Imajo dve pomembni lastnosti: nimajo jasno izražene meje, zato se zakoreninijo in neposredno vdirajo v okolna tkiva, in zmožni so se širiti v druge dele telesa. Skupki malignih celic se odluščijo od rakaste tvorbe in po limfnem ali krvnem obtoku potujejo v druga tkiva. Če pristanejo na ustreznem mestu, začnejo rasti nove rakaste tvorbe, t.i. zasevki ali metastaze. K sreči vse odluščene celice ne najdejo pravega mesta za rast, zato jih veliko odmre. Takšnemu načinu širjenja raka pravimo metastaziranje. Poznamo številne različne tipe raka. Pri osnovnem razvrščanju upoštevamo mesto oziroma organ, kjer se je rak pojavil (govorimo npr. o raku dojke, raku pljuč, raku želodca), natančnejšo vrsto pa določimo z mikroskopskim pregledom rakastega tkiva. Poznamo karcinome, sarkome, levkemije in limfome. Karcinomi so maligne vrste raka, ki zrastejo iz epitelnih celic (celic vrhnjice), ki gradijo večino telesnih organov. Ponavadi gre za organe, ki nekaj izločajo. V to kategorijo karcinomov uvrščamo okrog 80 odstotkov vseh rakov. Sarkomi so maligne vrste raka, ki zrastejo iz celic opornih tkiv in se pojavljajo zlasti v vezivu, maščevju, kosteh in hrustancu. Levkemije so rakaste bolezni krvi in krvotvornih organov. V nasprotju z večino drugih rakov se navadno ne pojavljajo v obliki bul ali zatrdlin. Limfomi so maligne vrste raka, ki se razvijejo v bezgavkah (8).

1.3.2. Rak sečnega mehurja

Rak sečnega mehurja je najpogostejša maligna bolezen urotrakta. V Sloveniji odkrijejo vsako leto približno 150 novih primerov bolnikov s to vrsto raka. Rak mehurja se pojavlja pogosteje pri moških kot pri ženskah. Incidenca je 10,3/100.000 pri moških in 4,5/100.000 pri ženskah (podatki RR za Slovenijo za leto 1990). Rak sečnega mehurja predstavlja 3 odstotke vseh rakavih obolenj pri moških. Največ ga je pri bolnikih od 50. do 70. leta starosti, vendar v zadnjih letih vse hitreje narašča v starostni skupini od 45. do 54. leta. Delež umrlih za rakom mehurja glede na celotno umrljivost za rakom v Sloveniji je 4 odstotke (10). Čeprav poznamo nekatere dejavnike tveganja za razvoj raka mehurja, še vedno ne vemo, kaj natančno ga povzroča. Rak sečnega mehurja se ne pojavlja v družinah, zato raziskovalci sklepajo, da dedne genske mutacije nimajo vloge pri tej bolezni. Menijo, da gre pri bolnikih za ljudi, ki so občutljivi za rakotvorne kemikalije v okolju ali v tobačnih izdelkih, ki se izločajo skozi ledvice v seč (11).

Rake mehurja razvrščamo v več tipov glede na celice, iz katerih so nastali. Sečila so obložena s celicami, ki jih imenujemo tranzicijske ali urotelijske celice. Pod njimi je tanka plast vezivnega tkiva, imenovana lamina propria, ki ločuje površinsko plast tranzicijskih celic od mišičja mehurja (8). Najpomembnejše vrste raka sečnega mehurja so urotelijski karcinomi (karcinom tranzicijskih celic ali TCC), adenokarcinomi in ploščatocelični ali skvamozni karcinomi. Včasih imajo bolniki z rakom mehurja podobne ali iste tipe raka tudi v ledvicah, sečevodih ali sečnici. Zato morajo zdravniki pred postavitvijo diagnoze previdno in natančno oceniti celotni sistem sečil. Urotelijski karcinom je najpogostejša oblika raka mehurja (okoli 90 odstotkov) (11). Plast tranzicijskih celic lahko naraste iz 3 do 4 plasti na 6 ali več nenormalnih plasti. Do tega pride, kadar so celice dražene s kemijskimi karcinogeni, pri kroničnih infekcijah mehurja, pri kroničnih in ponavljajočih se poškodbah (npr: ponavljajoče se kateterizacije) itd. Vsa ta draženja lahko povzročijo celične spremembe, ki se lahko razvijejo v raka (8). Urotelijske karcinome delimo glede na to, ali so invazivni ali neinvazivni ter ali je njihova oblika ploščata ali papilarna (bradavičasta, pecljata). Neinvazivni urotelijski karcinom zajema samo urotelija, invazivni urotelijski karcinom pa zajema poleg urotelija tudi globlje sloje stene mehurja. Zelo pomembno je določiti, do katerega sloja oz. kako globoko se je rak razširil. Če rak vrašča globoko v mišično steno mehurja, je to nevarneje kot če je omejen le na plitvejšje sloje. Urotelijski karcinom mehurja ima lahko papilarno ali ploščato obliko. Papilarni karcinom je po obliki podoben razvejanemu kaktusu in izrašča v votlino mehurja. Kaže različne nepravilnosti v velikosti, obliki in razporeditvi celic. Tisti, kjer je

relativno malo nepravilnosti, se redko vraščajo v steno mehurja (imajo nizek gradus), se pa po kirurškem posegu pogosto ponovijo. Karcinomi z večjimi nepravilnostmi se raje vraščajo v steno mehurja (imajo visok gradus) in zasevajo po telesu. Papilarne karcinome, ki rastejo navznoter v mehur hkrati pa tudi navzven, imenujemo invazivni papilarni urotelijski karcinomi. Benignim tipom papilarnega urotelijskega karcinoma pravimo papilomi. Le-ti se ne širijo v druge dele telesa in jih uspešno odstranimo s posegom. Zelo redko zrastejo znova ali se pojavijo kje drugje v sečilih. Papilarni urotelijski karcinomi z nizkim malignim potencialom so tumorji, ki se jih običajno da uspešno pozdraviti s kirurškim posegom. V tem primeru so ponovitve drugje v sečilih kar pogoste. Včasih so takšne nove tvorbe lahko rakaste ali celo invazivne. Druga oblika so ploščati urotelijski karcinomi, ki ne rastejo v votli del mehurja. Tisti, ki zajemajo le notranji sloj epitelijskega sloja, so neinvazivni ploščati urotelijski karcinomi. Imenujemo jih tudi ploščati carcinoma in situ (CIS). Drugi, ki vraščajo v globlje sloje stene mehurja (zlasti mišično), so ploščate invazivne urotelijske rakaste tvorbe (11). Preostala dva tipa raka sečnega mehurja sta adenokarcinom in skvamozni karcinom. Adenokarcinom se pri moških pojavlja v sečnici in njenih žlezah blizu prostate, skvamozni karcinom pa je najpogostejši tip raka sečnice pri ženskah (8). Zdravljenje se načrtuje pri vsakem bolniku posebej. Odvisno je od njegovega zdravstvenega stanja, obsežnosti raka in njegovih osebnih želja. Zgodnja diagnoza je ključnega pomena za boljšo prognozo (11).

Da bi določili stopnjo razširjenosti, torej kako globoko se rak vrašča v steno mehurja, če se je razširil v bezgavke in ali je že metastaziral, uporabljamo TNM klasifikacijo. Za oceno anaplazije pa je v rabi več klasifikacij. V Sloveniji uporabljamo klasifikacijo po Mostofiju, ki jo priporoča tudi Svetovna zdravstvena organizacija. Rake, ki so dobro diferencirani, označimo z gradus I, slabo diferencirane pa z gradus III.

Tabela 1: TNM klasifikacija (12).

Primarni tumor	
Ta	Neinvazivni papilarni tumor
Tis	In situ
T1	Subepitelni tumor
T2	Mišica T2a notranja polovica T2b zunanja polovica
T3	Skozi mišico T3a mikroskopsko T3b ekstrapelvicarna masivna invazija
T4	Infiltracija v okolne organe T4a v prostato, maternico, vagino T4b v medenico in trebušno mišičje
N1	Ena bezgavka do 2 cm
N2	Ena bezgavka od 2-5 cm, multiple= 5 cm
M1	Oddaljene metastaze

Najpogostejši simptom pri raku mehurja je hematurija. Je simptom, zaradi katerega gre večina bolnikov k zdravniku. Stopnja hematurije nam ne pove, v katerem stadiju je bolezen, saj se mikrohematurija lahko pojavi tudi pri napredovalem raku mehurja. Rak mehurja lahko povzroči znake draženja. Bolnik ima lahko bolj pogosto mikcijo, urgentno mikcijo, občasno zapiranje vode ter pri uriniranju čuti bolečino ali pečenje. Vendar so ti simptomi mnogo pogostejši pri vnetjih ali povečani prostati, sečnih kamnih, poškodbah ali pri različnih infekcijah. Kasnejši znaki, ki kažejo na bolj napredovalo bolezen, so izguba teka, hujšanje, vročina, bolečine v predelu ledvic, danke, medenice in v kosteh (8).

2. DIAGNOSTIKA RAKA SEČNEGA MEHURJA

2.1. Vrste najpomembnejših diagnostičnih preiskav

Za diagnostiko raka na sečnem mehurju se uporabljajo različna slikanja in laboratorijske preiskave.

2.1.1. Ultrazvok

Ultrazvok je neboleča in neškodljiva metoda slikanja. Na ustrezni predel kože namažemo tanek sloj želatine, nato pa v notranje organe pošiljamo visokofrekvenčne zvočne valove. Aparatura za ultrazvočno preiskovanje nariše sliko katerega koli organa, od katerega se zvočni valovi odbijajo (8). Ultrazvok se v onkologiji uporablja zelo pogosto, saj imajo tumorji drugačno strukturo kot normalno tkivo. Zaradi tega je njihova slika drugačna od slike normalnega tkiva. Ultrazvok se v rakastih tvorbah lahko odbija bolj (hiperehogeni tumorji) ali manj (hipoehogeni tumorji) kot v normalnem tkivu. Bolj ko je sestava raka homogena, bolj je ehogen. Ultrazvočna diagnostika je v veliko pomoč tudi pri citološkem ali histološkem odvzemu vzorca. Pod kontrolo žive ultrazvočne slike vstavimo iglo ter natančno odvezamo vzorec, ki se nam zdi primeren za mikroskopsko preiskavo (10). Ultrazvočna diagnostika ima pri diagnosticiranju rakov mehurja, njihovi zamejitvi ter spremljanju zelo pomembno vlogo. Je neinvazivna metoda ter omogoča zelo natančen pregled mehurja, vendar le, če je ta poln. Pri raku mehurja pokaže slabo omejeno maso, ki se lahko vrašča v steno pa tudi v okolna tkiva mehurja. Zaradi lege mehurja za sramno kostjo in globoko v medenici ga je z drugimi diagnostičnimi metodami težko oceniti (13). Poleg ultrazvočnega slikanja so pomembne še preiskave seča in krvi.

2.1.2. Preiskave seča

Mikroskopska analiza seča je pomembna pri ocenjevanju mikrohematurije. Za odkrivanje raka sečnega mehurja pri bolnikih s simptomi, med ogroženo populacijo brez simptomov, za spremljanje poteka bolezni med in po zdravljenju ter za odkrivanje ponovitev bolezni, izvajamo citološko preiskavo seča. Le-ta ima veliko diagnostično zanesljivost ter preprosti način odvzema vzorca. Posebno koristna je pri raku in situ ter pri rakih velikega gradusa.

Pozitivna citološka preiskava seča lahko pomeni rak prehodnega epitela od ledvičnih čašic pa do sečnice (12).

2.1.3. Krvne preiskave

Pri krvnih preiskavah ločimo specifične in nespecifične preiskave. Večina jih je nespecifičnih. Z njimi odkrijemo nenormalnost v krvi, ki naznanja bolezen, vendar pa nam ne pove, za katero bolezen gre. Tako nam rezultati testov presnove, delovanja jeter in krvna slika lahko kažejo na določene vrste raka, vendar na podlagi teh rezultatov ne moremo postaviti specifične diagnoze. Zato moramo opraviti še specifične teste, ki so lahko specifični za posamezne ali za več vrst rakov. Med specifične teste spada določanje koncentracije tumorskih označevalcev (8).

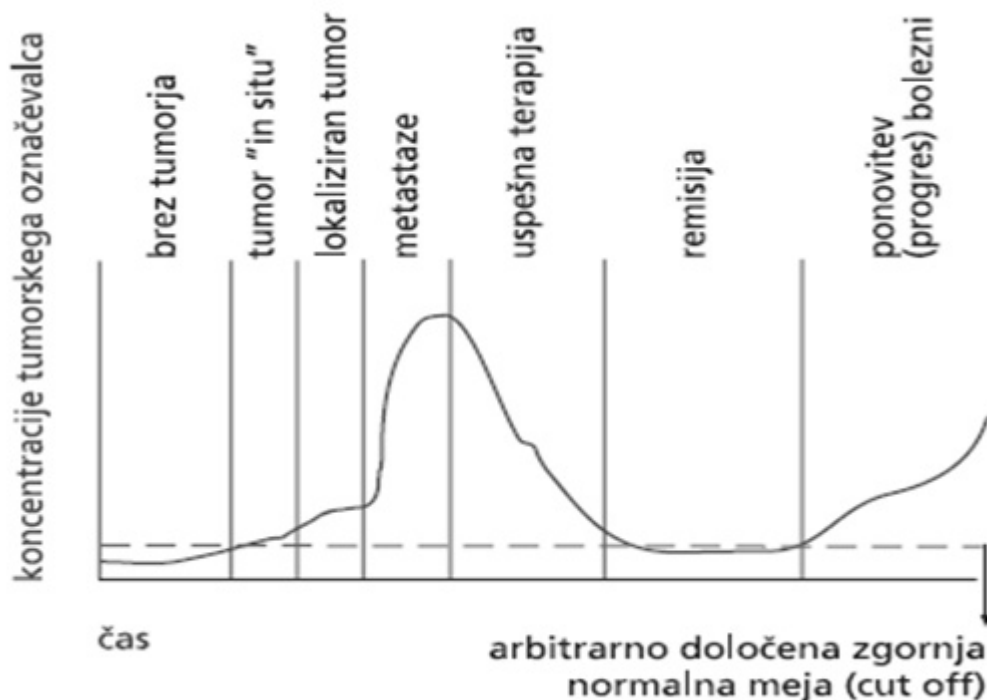
2.2. Tumorski označevalci

Tumorski označevalci so snovi, ki jih izločajo maligne celice oziroma snovi, ki nastanejo v drugih celicah pod vplivom delovanja malignih celic. Določamo jih v telesnih tekočinah, ponavadi v serumu ali plazmi. Tumorski označevalci so lahko snovi, ki so običajno prisotne v organizmu, le da jih najdemo v veliko nižjih koncentracijah ali snovi, ki so na novo sintetizirane in jih v zdravem organizmu ne najdemo.

2.2.1. Vloga in lastnosti tumorskih označevalcev

V klinični onkologiji nam določanje tumorskih označevalcev pomaga pri diagnozi bolezni in napovedovanju njenega poteka, pri določanju stadija bolezni, pri izbiri načina zdravljenja ter pri zgodnjem odkrivanju ponovitve in razširitve bolezni. Vsi doslej znani tumorski označevalci niso preveč primerni za odkrivanje primarnih rakavih obolenj, zato se jih le redko uporablja kot presejalno metodo. Vzroki za to so nizka specifičnost za tkivo, organ in vrsta rakavega obolenja ter slabe napovedane lastnosti. Posamezne tumorske označevalce uporabljamo z različnim namenom. Nekateri so primernejši za spremljanje dinamike bolezni in drugi za zgodnje odkrivanje ponovitve bolezni (9). Tumorski označevalci nam lahko služijo tudi kot napovedni dejavniki. Spremljanje maligne bolezni pred zdravljenjem, med njim in po njem ter skrbna obdelava podatkov, nam lahko pove veliko o naravi maligne bolezni in s tem

o prognozi bolnika. Izredno visoke koncentracije tumorskega označevalca so slab prognostični pokazatelj (14).



Graf 1: Idealno spremljanje serumskih koncentracij tumorskega označevalca pri bolniku z določeno vrsto maligne bolezni glede na potek bolezni (15).

Koncentracija ali sprememba koncentracije tumorskega označevalca je odvisna od naslednjih dejavnikov:

- števila celic, ki proizvajajo tumorski označevalec, in s tem od velikosti, razširjenosti in stadija tumorja,
- hitrosti sinteze,
- hitrosti sproščanja iz tumorskih celic oz. celičnih površin,
- stopnje izražanja tumorskih označevalcev - če tumor ne izraža označevalca, ne more priti do njegovega povišanja,
- tipa tumorja - tumorske celice lahko izražajo tumorski označevalec, vendar ni nujno, da se ta sprošča v telesne tekočine,
- prekrvavljenosti tumorja - slabša kot je, manjši delež označevalca preide v krvni obtok,
- stopnje nekroze tumorskega tkiva - večji kot je razpad celic, večje je povišanje ravni označevalca,
- biološkega razpolovnega časa tumorskega označevalca,

- vpliva protiteles - pri nastanku imunskih kompleksov je hitrost izločanja označevalcev odvisna od velikosti teh kompleksov (9).

Da bi bila interpretacija rezultatov lažja, moramo narediti več določitev tumorskih označevalcev v različnih stadijih bolezni ter spremljati gibanje njihovih koncentracij. Pri tem moramo upoštevati biološko razpolovno dobo. Ta predstavlja čas, v katerem prvotna koncentracija tumorskega označevalca pade na polovico. Pri bolniku z visokimi začetnimi koncentracijami označevalcev ne moremo pričakovati, da se bodo te normalizirale takoj po uspešnem zdravljenju. Upoštevati moramo njihov biološki razpolovni čas in šele potem lahko ocenimo uspešnost zdravljenja. Biološki razpolovni čas je lahko dolg od nekaj ur pa do nekaj tednov. Koncentracije tumorskih označevalcev v telesnih tekočinah so zelo majhne, zato za njihovo dokazovanje potrebujemo visoko občutljive metode. Vse tehnike, ki jih uporabljamo, temeljijo na podobnem principu. Določa se nastanek kompleksov med antigeni in protitelesi. Najpogosteje se uporabljajo radioimunološke, encimskoimunske in luminometrične metode. Med seboj se razlikujejo po spojini, ki je vezana na detekcijska protitelesa, in po načinu detekcije nastalih kompleksov. Vse te metode so prilagojene dokazovanju izredno nizkih koncentracij antigena, torej imajo visoko analitsko občutljivost, medtem ko se analitska specifičnost pri različnih metodah lahko razlikuje. Specifičnost je odvisna od kvalitete uporabljenih protiteles ter od specifičnosti protiteles za posamezen tumorski označevalec (antigen). Povsem diagnostično specifičen tumorski označevalec ali metoda za spremljanje prisotnosti malignih tumorskih celic ne obstaja. Prav zaradi tega je velika uporabnost tumorskih označevalcev v onkologiji možna samo teoretično, saj je dejanska uporabnost odvisna od diagnostične občutljivosti in specifičnosti označevalca ter od zanesljivosti drugih metod, ki so na voljo za doseg istega cilja. Vse do danes ne poznamo nobenega tumorskega označevalca (antigena), ki bi obstajal samo v malignih celicah, kar pomeni, da lahko protitelesa proti posameznim tumorskim označevalcem navzkrižno reagirajo tudi z drugimi antigenskiimi strukturami. Zato moramo pri vrednotenju rezultatov vedeti, da je poleg maligne bolezni še veliko drugih možnih vzrokov, ki bi lahko bili krivi za povišanje koncentracije označevalca (14). Koncentracija označevalca lahko naraste tudi pri vnetjih, benignih tumorjih, boleznih jeter in trebušne slinavke, v nosečnosti, med menstruacijo in v času laktacije.

Kljub številnim znanim tumorskim označevalcem zaenkrat še ne obstaja idealen, vendar če bi obstajal, bi imel naslednje lastnosti:

- nastajal bi samo v tumorju oz. v njegovih celicah,
- značilen bi bil za tumorje posameznega organa,
- značilen bi bil za vrsto tumorja,
- določljiv bi bil v telesnih tekočinah vseh bolnikov z istim tipom tumorja,
- tvoril bi se v zadostnih količinah,
- dokazljiv bi bil v telesnih tekočinah že na začetku razvoja tumorja,
- njegove koncentracije bi odražale dinamiko rasti oz. velikost tumorske mase (9).

Pomanjkljivosti do sedaj znanih tumorskih označevalcev so:

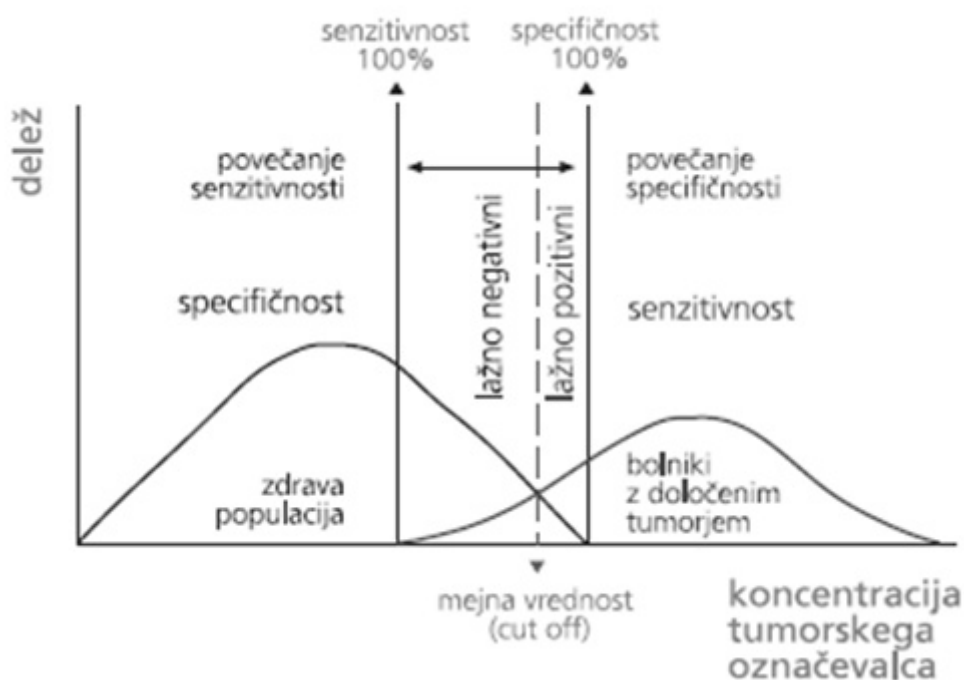
- nezadostna specifičnost za vrsto rakave bolezni,
- tvorba tumorskih označevalcev v visokih koncentracijah pri nemalignih procesih (različna vnetja, benigni tumorji, bolezni jeter in trebušne slinivke),
- tvorba pri različnih fizioloških stanjih (nosečnost, menstruacija, laktacija),
- tvorba v povsem zdravih tkivih.

Vlogo in uporabno vrednost posameznega tumorskega označevalca ter metode za določeno vrsto rakave bolezni natančno opredelimo s pojmom diagnostična občutljivost in specifičnost. Občutljivost tumorskega označevalca nam pove, pri kolikšnem deležu bolnikov z določeno vrsto tumorja je vrednost označevalca povišana. Večji kot je delež bolnikov z isto vrsto tumorja, pri katerem je vrednost označevalca povišana, tem večja je občutljivost označevalca. Pri tumorskem označevalcu z visoko občutljivostjo pričakujemo zelo majhno število lažno negativnih določitev. Specifičnost pa predstavlja delež preiskovancev z normalno koncentracijo tumorskega označevalca med preiskovanci, ki nimajo določene vrste raka. Torej je označevalec tem bolj specifičen, čim manjkrat je prisoten pri ljudeh brez določene vrste tumorja oziroma čim manj je lažno pozitivnih določitev.

Tabela 2: Izračun občutljivosti in specifičnosti

	Povišana vrednost tumorskega označevalca	Normalna vrednost tumorskega označevalca
Število bolnikov z določeno vrsto maligne bolezni	A	B
Število pacientov brez določene vrste maligne bolezni	C	D
Izračun občutljivosti/specifičnosti	OBČUTLJIVOST=A/(A+B)	SPECIFIČNOST=D/(C+D)

Idealen tumorski označevalec bi moral imeti 100 - odstotno občutljivost in specifičnost za določeno vrsto rakave bolezni, referenčna vrednost pa bi morala biti 0. Referenčna vrednost je arbitrarno določena koncentracija tumorskega označevalca. Če vrednost označevalca preseže referenčno vrednost, govorimo o povišanih vrednostih. Tumorski označevalci so snovi, ki so prisotne tudi v drugih celicah, zato mora biti referenčna vrednost vedno večja od 0. Postavljena je tako, da dosežemo kompromis med občutljivostjo in specifičnostjo tumorskega označevalca. Če povečamo specifičnost za neki označevalec pomeni, da istočasno zmanjšamo občutljivost. Če pa povečamo občutljivost pomeni, da istočasno zmanjšamo specifičnost označevalca. Referenčna vrednost mora biti postavljena tako, da imamo čim manj lažno negativnih in čim manj lažno pozitivnih določanj. Če lahko pri isti vrsti rakavega obolenja določamo več označevalcev, lahko z njihovo kombinacijo povečamo občutljivost, vendar s tem zmanjšamo specifičnost. S pravilno izbiro označevalcev se specifičnost spremeni minimalno, medtem ko se občutljivost močno poveča. Pri izbiri označevalcev moramo paziti na njihovo visoko specifičnost in komplementarnost za isto vrsto tumorja. Da sta dva označevalca komplementarna, morata biti povišana pri različnih bolnikih z isto vrsto maligne bolezni (14).



Graf 2: Prikaz, kako lahko s spreminjanjem referenčne vrednosti (mejne vrednosti) povečujemo občutljivost (senzitivnost) in zmanjšujemo specifičnost ter obratno (15).

Tumorske označevalce lahko uporabljamo tudi za dokazovanje malignega procesa na splošno. Pri tem nas ne zanima, za katero vrsto raka gre, ampak samo potrditev, da pri bolniku obstaja maligna bolezen.

2.2.2. Delitev tumorskih označevalcev

Tumorske označevalce lahko razdelimo glede na njihovo kemično strukturo, mesto nastanka, vrsto tumorskih bolezni, pri katerih naj bi jih določali, itn. Največkrat uporabljamo razdelitev, ki skuša strniti njihove biokemične lastnosti, mesto nastanka ter funkcionalnost. Glede na to razdelitev ločimo naslednje tumorske označevalce:

- onkofetalni proteini,
- hormoni in karcinoplacentarni antigeni,
- encimi,
- tumor spremljajoči antigeni,
- posebni serumski proteini,
- skupina mešanih označevalcev.

2.2.2.1. Onkofetalni proteini

Onkofetalni proteini so antigeni, ki normalno nastajajo med embrionalnim razvojem. Pri odraslih ljudeh je njihova tvorba omejena ali se popolnoma ustavi. Če so ti antigeni povišani pri odraslih ljudeh, pomeni, da je prišlo do ponovne aktivacije nekaterih genov, ki kontrolirajo rast celic in so neposredno povezani z malignim procesom.

Karcinoembrionalni antigen (CEA) je značilni predstavnik onkofetalnih proteinov. Spada med ene najdlje znanih tumorskih označevalcev. Gre za glikoprotein z molekularno maso okrog 180 KD, ki so ga prvič izolirali iz ekstrakta tkiva črevesnega adenokarcinoma. Nastaja med embrionalnim razvojem v epitelijskih celicah gastrointestinalnega trakta, jeter in trebušne slinavke. Takoj po odkritju so mislili, da gre za idealni tumorski označevalec za raka širokega črevesa in danke, vendar so kmalu ugotovili, da je CEA prisoten tako v nekaterih normalnih tkivih odraslih ljudi kot tudi pri drugih malignih boleznih. Tako lahko povišane serumske koncentracije CEA, razen pri bolnikih z maligno boleznijo, zasledimo tudi pri hudih kadilcih, pri bolnikih z bronhitisom, gastritisom, duodenalnim ulkusom, jetrnimi okvarami, pankreatitisom, polipi širokega črevesa ter danke itn. Povišane koncentracije CEA se pojavljajo tudi pri bolnikih z drugimi malignimi boleznimi, kot so rak trebušne slinavke, pljuč, želodca, jeter, dojke, mehurja, jajčnikov in endometrija. Kljub svojim pomanjkljivostim je CEA pomemben tumorski označevalec za spremljanje bolnikov z rakom širokega črevesa in danke. Povišane koncentracije tega označevalca se pojavljajo pri 65 odstotkih vseh bolnikov s to boleznijo (vključno s tistimi z lokalizirano boleznijo in stadijem I) in pri vseh bolnikih, ki imajo metastatsko razširjeno bolezen. CEA lahko uporabljamo tudi za spremljanje raka dojke, jajčnikov, trebušne slinavke, pljuč in jeter. Če je serumska koncentracija CEA med 4 in 10 $\mu\text{g/L}$ lahko pomeni, da gre za bolnike z malignimi boleznimi, z benignimi boleznimi ali za hude kadilce, serumske koncentracije višje od 10 $\mu\text{g/L}$ pa kažejo bolj na maligni proces.

Drugi predstavnik onkofetalnih proteinov je *alfa-fetoprotein (AFP)*. Poznamo ga enako dolgo kot CEA. Odkrili so ga v serumu mišk s hepatocelularnim karcinomom. Gre za glikoprotein z molekularno maso okrog 70 KD, ki nastaja med embrionalnim razvojem v rumenjaku, vrečki, celicah epitelijskega, gastrointestinalnega trakta in jeter. AFP med nosečnostjo prehaja skozi plodove krvi v amnijsko tekočino in skozi placente v materino kri. Zaradi tega so serumske koncentracije AFP pri nosečnicah odvisne predvsem od trajanja nosečnosti. Prisotnost AFP pri nosečnicah je lahko znak tudi za različne anomalije ploda ali prisotnost večjega števila plodov. Pri odraslih ljudeh je koncentracija AFP v krvi zelo majhna. Normalne vrednosti AFP

v serumu se vzpostavijo v približno 9. mesecu starosti. Povišanje koncentracije AFP v serumu odraslih nad 10 µg/L je znak za akutni virusni hepatitis, jetrno cirozo ter za rak trebušne slinavke, pljuč in želodca. AFP ima poseben pomen za spremljanje bolnikov z jetrnim karcinomom in pri bolnikih z ne seminomskimi germinalnimi tumorji. Pri bolnikih z jetrnim karcinomom daje 95 do 100-odstotno občutljivost in specifičnost, pri bolnikih z ne seminomskimi germinalnimi tumorji pa ima 60-odstotno specifičnost. Koncentracija AFP nad 1200 µg/L potrjuje prisotnost primarnega jetrnega karcinoma.

2.2.2.2. Hormoni

Ralične maligne novotvorbe lahko sprožijo spremembe v sintezi ter izločanju raznih hormonov. Kvantitativne in kvalitativne spremembe v sintezi in izločanju določenih hormonov so lahko znak za maligni proces. Kadar se tumorji razvijejo v tkivu endokrinih žlez, se zaradi transformacije celic produkcija hormona lahko poveča ali zniža. V tem primeru govorimo o kvantitativnih spremembah. V to skupino prištevamo hormone endokrinih tumorjev kot so insulin, parathormon, prolaktin, kateholamine in druge. Do kvalitativnih sprememb pride takrat, ko maligno transformirane celice nekaterih organov začnejo tvoriti hormone. Tako tvorbo hormonov imenujemo ektopična tvorba hormonov. Pri raku dojke se lahko začeta tvoriti kalcitonin in parathormon, pri malignomih timusa se lahko tvorijo insulin in prav tako kalcitonin ter parathormon, pri karcinoidnih tumorjih se lahko tvori hormon lipotropin itn.

Med vsemi znanimi hormoni se je kot tumorski označevalec najbolj uveljavil *horiogonadotropin (bHCG)*. Gre za protein z molekularno maso okrog 45 KD, ki ga uvrščamo tudi v posebno skupino karcinoplacentarnih antigenov. Karcinoplacentarni antigeni so proteini, ki nastajajo v placenti med nosečnostjo in so pri odraslih redko kdaj prisotni. Hormon bHCG se uporablja v hitrih testih za zgodnje odkrivanje nosečnosti. Njegova koncentracija je povečana tudi pri večini ženskih in moških bolnikov z germinalnimi tumorji ter pri bolnikih z nekaterimi drugimi bolezenskimi stanji. bHCG ima zelo kratki biološki razpolovni čas v serumu (36 do 48 ur), zato je uporaben za spremljanje odgovora na zdravljenje ter prognozo. V kombinaciji z AFP je bHCG zelo dober tumorski označevalec za spremljanje germinalnih tumorjev. Težava je le pri 10 odstotkih germinalnih tumorjih, ki ne izločajo tumorskih označevalcev. Pri bolnikih s tako vrsto tumorja bHCG žal ne moremo uporabiti za diagnostiko in spremljanje bolezni. bHCG se rahlo poveča tudi pri bolnikih z rakom dojke, želodca, pljuč, jeter ali širokega črevesa, vendar pa pri spremljanju in diagnozi teh bolezni nima pomembne vloge.

2.2.2.3. Encimi

Kot tumorske označevalce lahko uporabljamo samo tiste encime, katerih povečana tvorba je rezultat poteka malignega procesa v organizmu.

Eden od teh encimov je *prostatična kislja fosfataza*, ki nastaja v normalnem tkivu prostate. Njena molekulska masa je 100 KD in je sestavljena iz dveh identičnih podenot. Koncentracije prostatične kisle fosfataze se povišajo (nad 3 µg/L) v primerih bolnikov z rakom prostate, kar običajno pomeni napredovalo fazo bolezni. Zaradi tega je določanje njene koncentracije primerno za razlikovanje benignih procesov od malignih. Zavedati se moramo tudi tega, da so serumske koncentracije prostatične kisle fosfataze lahko povišane tudi do 5-krat, če kri odvzamemo prej kot v 48 urah po kakršnemkoli fizikalnem pregledu prostate. Da zaradi tega ne bi prišlo do lažno pozitivnih določitev, moramo kri za določanje tega tumorskega označevalca odvzeti pred pregledom ali pa več kot 48 ur po rektalnem pregledu. Drugi encim je alkalna fosfataza, ki obstaja kot vrsta izoencimov. Ti nastajajo v jetrih, kosteh, placentih itn. Če je njena serumska koncentracija povišana, ponavadi pomeni metastatsko razširitev bolezni v jetra in/ali kosti oziroma prisotnost primarnega kostnega malignega tumorja (osteosarkoma). Naslednji encim je *nevronska specifična enolaza (NSE)*, ki je glikoplazemski glikolitični encim. Najprej so ga dokazali v celicah neuroektodermalnega izvora in nevronih. Kasneje so ugotovili, da se nahaja tudi v tkivu tumorjev z neuroektodermalno ali neuroendokrino diferenciacijo. Povišana koncentracija NSE (nad 15 µg/L) lahko pomeni razvoj nevroblastoma, drobnoceličnega raka pljuč ali medularnega raka ščitnice.

V skupino encimskih tumorskih označevalcev spadajo še nekateri nespecifični encimi, kot so na primer *laktat dehidrogenaza (LDH)*, *gama glutamil transpeptidaza (GGT)* in *timidin kinaza (TK)*. LDH je velikokrat povišana v serumu bolnikov z limfomi in germinalnimi tumorji, GGT naj bi kazala na holestazo in prisotnost jetrnih metastaz ter TK naj bi pomagala pri presoji o razširjenosti bolezni pri bolnikih z levkemijo, limfomom, možganskimi tumorji, drobnoceličnim rakom pljuč ali rakom dojke.

2.2.2.4. Tumor spremljajoči antigeni

Gre za heterogeno skupino tumorskih označevalcev, v katero spadajo različne membranske strukture tumorskih celic. Proti tem antigenom je možno tvoriti specifična monoklonska protitelesa, kar s pridom izkorišča sodobna tehnologija. Določena antigenska struktura je značilna za določene tumorske celice. Zato so označevalci, ki spadajo v to skupino, bolj specifični za določeno vrsto malignega tumorja od ostalih označevalcev in velikokrat njihove serumske koncentracije natančneje odražajo rast ali zmanjšanje tumorske mase. Vendar še

vedno ne poznamo popolnoma specifične antigenske strukture, ki bi bila specifična samo za rakave celice, zato najdemo tudi te označevalce v normalnih tkivih. Ampak kljub temu so serumske koncentracije teh označevalcev pri bolnikih z rakom statistično značilno višje kot pri ljudeh, ki so zdravi oziroma nimajo maligne bolezni.

Karcinomski antigen 15-3 (CA 15-3) je ogljikohidratni antigen, ki ga določamo z dvema različnima monoklonskima protitelesoma, ki sta se sposobna vezati na različnih mestih antigena. CA 15-3 nastaja v sekretornem epiteliju (pljuč, gastrointestinalnih organov, dojk, maternice...) in je velikokrat prisoten v izločkih zdravih ljudi. CA 15-3 ni specifičen označevalec ne za vrsto tumorja ne za organ. Povišane serumske koncentracije (nad 30 kU/L) najdemo največkrat pri bolnicah z rakom dojke, lahko pa tudi pri bolnikih z rakom pljuč, prostate, jajčnikov, materničnega vratu in gastrointestinalnega trakta ali pri nosečnicah med 38. in 40. tednom nosečnosti. Kljub temu je pri bolnicah z rakom dojke, pri katerih se tvori, dober pokazatelj uspešnosti zdravljenja in poteka bolezni. Na koncentracijo CA 15-3 v serumu lahko vpliva tudi prisotnost nekaterih netumorskih bolezni dojke in prisotnost benignih tumorjev dojke (koncentracija ponavadi pod 40 kU/L). Če pri bolnicah z rakom dojke določamo CA 15-3 skupaj z CEA povečamo občutljivost in ohranimo solidno specifičnost.

Mucinski karcinomski antigen (MCA) je tumorski označevalec značilen pri bolnicah z rakom dojke. MCA drugače nastaja pri odraslih v normalnem epiteliju dojke, ledvic, endometrija, uretre in prostate. Njegova specifičnost pri raku dojke z mucinsko komponento je večja od 80 odstotkov in občutljivost okrog 70 odstotkov. Zaradi tega je dober označevalec za zgodnje odkrivanje ponovitve bolezni pri bolnicah z rakom ter za spremljanje dinamike bolezni in odgovora na zdravljenje. Povišane koncentracije MCA v serumu se pojavljajo tudi pri bolnikih z drugimi malignimi tumorji epiteljskega izvora in pri nosečnicah (v prvem in drugem trimesečju pri 57 odstotkih, v tretjem trimesečju pri 100 odstotkih).

Karcinomski antigen 125 (CA 125) je tumorski označevalec značilen za bolnice z rakom jajčnikov. Gre za glikoprotein, ki ima molekulsko maso okrog 200 KD in se pojavlja pri več kot 80 odstotkih bolnic z nemucinoznim rakom jajčnikov. CA 125 nastaja med embrionalnim razvojem v celomskem epiteliju, Mullerjevih vodih, mezotelnih celicah plevre, perikarda in peritoneja. Pri odraslih je prisoten v sluznici materničnega vratu in pljučnem parenhimu, ne nastaja pa v tkivu zdravih jajčnikov. Povišane serumske koncentracije CA 125 (nad 35 kU/L) najdemo, razen pri bolnicah z rakom jajčnikov, tudi pri bolnicah z benignimi in malignimi ginekološkimi boleznimi (ciste jajčnikov, rak materničnega vratu) ter pri nekaterih bolnikih z neginekološkimi malignimi boleznimi (rak pljuč, rak prostate). Od vseh tipov raka jajčnikov

je CA 125 najbolj zanesljiv in uporaben za spremljanje bolnic, ki imajo epitelijski ali nediferencirani rak jajčnikov.

Karcinomski antigen 19-9 (CA 19-9) je glikolipid, ki je pravzaprav spremenjen Lewisov hapten iz sistema krvnih skupin. Monoklonska protitelesa proti tej mucinski antigenski determinanti reagirajo navzkrižno z različnimi mucinskimi molekulami. Do navzkrižne reakcije pride samo pri osebah z aktivnim Lewis genom. Pri osebah z neaktivnim Lewis genom se ta determinanta sploh ne tvori in označevalec ni uporaben za spremljanje bolezni. CA 19-9 je označevalec, ki je bolj specifičen za rak trebušne slinavke in jeter, velikokrat pa je povišan tudi pri bolnikih z rakom širokega črevesa, danke, želodca in jajčnikov. Ker ga najdemo v relativno visokih koncentracijah v različnih telesnih tekočinah zdravih odraslih ljudi (v semenski tekočini, želodčnem soku, amnijski tekočini ter v izločkih trebušne slinavke), ga je smiselno določati le v serumu ali plazmi, kjer so koncentracije povišane le ob bolezenskih spremembah.

Prostatični specifični antigen (PSA) je protein (serinska proteaza), velik okoli 30 do 40 KD, ki so ga prvič izolirali iz ekstrakta tkiva prostate in semenske tekočine. Tvori se v tkivu prostate in se izloča v semensko tekočino, kjer preprečuje koagulacijo semenske tekočine. Majhne količine PSA prehajajo pri zdravih ljudeh tudi v krvni obtok, vendar je njegova koncentracija v krvi neprimerljiva z višino koncentracije v semenski tekočini. Koncentracija v serumu se močno poveča le v primeru bolnikov s patološkimi spremembami prostate, zlasti z rakom. PSA se v serumu lahko pojavlja v neaktivni prekurzorski obliki ali vezan na proteinazne inhibitorje. Proteinazni inhibitorji so lahko alfa-1-antihimotripsin (ACT), alfa-1-proteinazni inhibitor, alfa-2-mikroglobulin ali alfa-antitripsin. Največji delež PSA v serumu je vezan v kompleks z ACT (60 do 90 odstotkov), temu sledi delež v prosti prekurzorski obliki (10 do 40 odstotkov) in najmanjši delež PSA v serumu predstavljajo druge oblike, ki jih je manj kot 1 odstotek. ACT je tumorski označevalec, ki je visoko občutljiv in specifičen za rak prostate. Njegove serumske koncentracije zelo dobro spremljajo velikost tumorske mase, zato ga pogosteje uporabljamo za spremljanje bolnikov z rakom prostate kot prostatično kislom fosfatazo. Pri njegovem določanju se moramo zavedati, da lahko koncentracija PSA v krvi naraste tudi zaradi fizikalnega pregleda prostate, zato je treba bolnikom odvzeti kri pred pregledom prostate ali vsaj 48 ur po njem. PSA uporabljamo tudi za presejanje bolnikov z rakom prostate. Izvaja se pri moških starejših od 50 let, ki imajo več dejavnikov tveganja (oče ali več generacij v družini z rakom prostate). Z določanjem različnih oblik PSA ter s pravilno evaluacijo deležev prostega in celotnega PSA lahko dokaj zanesljivo določimo, če gre za benigno ali maligno spremembo. Če je serumska koncentracija celotnega PSA večja kot 10

$\mu\text{g/L}$ pomeni, da gre za maligni proces. Težava je v interpretiranju izvidov med 2 in 10 $\mu\text{g/L}$. V tem primeru si pomagamo z določanjem prostega in celotnega PSA. Če je njuno razmerje 0.2 ali manj, gre najverjetneje za maligno bolezen, če pa je razmerje večje kot 0.2, govori to v prid benigne bolezni. Z določanjem tega razmerja, z digitalnim rektalnim pregledom ter ultrazvočno preiskavo prostate lahko z veliko gotovostjo sklepamo, če gre za benigni ali maligni proces in s tem zmanjšamo delež nepotrebnih biopsij za več kot 30 odstotkov. Edina težava pri tem je, da lahko na takšen način spregledamo 6 do 10 odstotkov bolnikov, ki imajo rak prostate.

2.2.2.5. Posebni serumski proteini

Med posebne serumske proteine uvrščamo različne proteine. Eden najbolj znanih je protein *ferritin*. Njegova naloga v telesu je znotrajcelična vezava železa in detoksikacija (npr. vezava prostih radikalov). V višjih koncentracijah ga normalno najdemo v jetrih, vranici in kostnem mozgu. S pomočjo serumskih koncentracij in odnosa različnih podenot tega encima lahko sumimo na maligni proces. H-podenota prevladuje v malignem tumorskem tkivu, HL-podenota pa normalnem tkivu. Normalna koncentracija ferritina v serumu je od 8 do 440 $\mu\text{g/L}$. Njegova koncentracija se poveča pri bolnikih z akutno levkemijo, limfomi, rakom pljuč, jeter in prostate.

Tiroglobulin je znotrajcelični glikoprotein, katerega naloga je nastanek in shranjevanje tiroksina. V nizkih koncentracijah (0 do 75 $\mu\text{g/L}$) ga lahko najdemo pri večini zdravih ljudi, medtem ko so njegove koncentracije močno povišane pri bolnikih z medularnim folikularnim karcinomom ščitnice. Kljub visokim koncentracijam tiroglobulin ni primeren označevalec za spremljanje razvoja in dinamike te vrste tumorske bolezni. Njegove vrednosti so lahko povišane tudi pri anaplastičnem karcinomu.

Beta-2-mikroglobulin je protein, ki se nahaja na celični membrani skoraj vseh diferenciranih celic. Razlog za to je njegova zgradba, ki je identična lahki verigi HLA. V nizkih koncentracijah (1.2 do 2.5 $\mu\text{g/L}$) ga najdemo v vseh telesnih tekočinah. Najdemo ga v dveh oblikah, lahko je vezan na HLA ali prost. Njegova koncentracija se lahko poviša zaradi več različnih vzrokov: povečane sinteze proteina zaradi hitrejše delitve celic, hitrega razpada celičnih membran, odmiranja celic, močnejšega delovanja imunskega sistema ter zaradi zmanjšanja filtracijske kapacitete ledvic (98 odstotkov se ga izloči preko ledvic). Povišane serumske koncentracije najdemo pri bolnikih z rakom pljuč, dojke, trebušne slinavke, širokega črevesa ter danke, pri bolnikih z limfomi in kronično limfatično levkemijo.

S-100 protein so prvič izolirali iz govejih možganov. Najprej so mislili, da gre za specifičen možganski označevalec, vendar so kasneje ugotovili, da je S-100 protein prisoten tudi v različnih zdravih tkivih. Njegova normalna koncentracija v serumu je nižja od 0.3 µg/L. S-100 protein lahko uporabljamo kot kazalec poškodb v centralnem živčnem sistemu ali kot tumorski označevalec pri bolnikih z nevrinomom, glioblastomom, astroцитomom in meningeomom. Pri bolnikih z malignim melanomom ima posebno vlogo, uporablja se ga kot napovedni dejavnik in za spremljanje zdravljenja. Če je koncentracija pri tej vrsti bolezni manjša od 0.3 µg/L, pomeni 85-odstotno 3-letno preživetje bolnika, če je koncentracija od 0.3 do 0.6 µg/L pomeni 50-odstotno 3-letno preživetje bolnika in če je večja od 0.6 µg/L pomeni 10-odstotno 3-letno preživetje bolnika.

2.2.2.6. Skupina različnih tumorskih označevalcev

V to skupino spadajo tumorski označevalci, katerih tvorba izredno dobro spremlja spremembe v hitrosti proliferacije celic. Gre za heterogeno skupino označevalcev, katerih značilnost je, da niso specifični za posamezne tumorje, ampak na splošno nakazujejo na možnost obstoja maligne bolezni. V to skupino prištevamo poliamine, nukleozide in tkivni polipeptidni antigen.

Poliamine (kot so spermin, spermidin in putrescin) so dokazali v povišanih koncentracijah v urinu, kadar so se celice določenega tkiva hitro nadomeščale z novimi celicami.

Nukleozidi (kot sta dimetilgvanozin in psevdouridin, ki sta komponenti RNA) se izločajo v cirkulatorni sistem v večjih koncentracijah prav tako kot poliamini, kadar gre za povečano celično proliferacijo.

Tkivni polipeptidni antigen (TPA) je prav tako nespecifičen tumorski označevalec hitre delitve celic. Njegova molekulska masa je okrog 180 KD in je sestavljen iz različnih citokeratinskih enot. Prva enota je citokeratin 19 (44 odstotkov), druga je citokeratin 18 (36 odstotkov) in tretja je citokeratin 8 (30 odstotkov). Med embrionalnim razvojem TPA nastaja v različnih tkivih ploda ter v placenti, pri odraslih ljudeh pa je sestavni del celičnega skeleta normalnih in tumorskih celic. TPA nastaja med S-fazo celičnega ciklusa. Njegove koncentracije odražajo hitrost delitve celic, saj hitrejša delitev celic narekuje hitrejšo sintezo TPA. Posledica hitrejša sinteze je prehajanje večje količine TPA v cirkulatorni sistem. Zaradi tega je TPA splošen tumorski označevalec, ki spremlja patološko proliferacijo celic (ponavadi pri maligni transformaciji) ne glede na vrsto ali lokalizacijo tkiva. Normalne serumske koncentracije TPA so približno do 90 kU/L, koncentracije višje od 120 kU/L pa so lahko posledica malignega ali

benignega procesa. Za razliko od drugih tumorskih označevalcev serumske koncentracije TPA slabo odražajo velikost tumorske mase (14).

2.3. Tumorski označevalec Cyfra 21-1

Tumorski označevalec Cyfra 21-1 je fragment citokeratina 19. Citokeratini so proteini, ki sestavljajo intermedialne filamente citoskeleta. Poznamo 20 različnih citokeratinov, ki jih na osnovi njihovih biokemijskih lastnosti delimo v dve skupini. Skupino tipa I predstavljajo kisli citokeratini (citokeratini 9-20) in skupino tipa II predstavljajo alkalni ali nevtralni citokeratini (citokeratini 1-8). Citokeratini so netopni v telesnih tekočinah, zato jih ne moremo določati. Fragmenti citokeratinov kot je npr. Cyfra 21-1 pa so topni v telesnih tekočinah, tako da jih lahko določamo. Izražanje citokeratinov je odvisno od vrste epitelija, lege celic v epiteliju in od diferenciacije epiteljskih celic. V enostavnih epitelijih npr. črevesa se pojavljajo citokeratini 7,8,18,19 in 20, v večskladnih epitelijih npr. kože in sluznice grla se pojavljajo citokeratini 1,2,3,4,5,6,9,10,11,12,13,14,15,16 in 17 ter v večvrstnih ali prehodnih epitelijih se pojavljajo citokeratini 4,7,8,13,17,18,19 in 20. Določanje prisotnosti citokeratinov nam lahko pojasni izvor tumorskih celic in stopnjo diferenciacije tumorjev, zato se veliko uporablja v patološki diagnostiki (16). Cyfra 21-1 se nahaja v vseh tkivih telesa, zato so pričakovali, da bodo njegove vrednosti povišane pri številnih boleznih, vendar ni tako. Zaenkrat se ga kot tumorski označevalec največ uporablja pri bolnikih z rakom pljuč in sečnega mehurja. Z določanjem Cyfre 21-1 v serumu bolnikov z rakom pljuč lahko prepoznamo vrsto tumorja in spremljamo potek zdravljenja. Pri bolnikih z rakom sečnega mehurja pa ima pomembno vlogo pri zgodnjem prepoznavanju karcinoma mehurja, ki se je začel razraščati v mišično tkivo. Koncentracije cyfre 21-1 v serumu zdravih ljudi so manjše od 2.0 µg/L. Cyfra 21-1 ni organsko specifični označevalec. Njegove vrednosti so odvisne od stadija bolezni, prognoze in uspešnosti zdravljenja bolnikov (17).

2.3.1. Raziskava o kliničnem pomenu Cyfre 21-1 v primerjavi z ustaljenimi tumorskimi označevalci

Bram Wieskopf je s sodelavci naredili raziskavo, v kateri so ugotavljali, kakšna je klinična uporabnost Cyfre 21-1 v primerjavi z ostalimi tumorskimi označevalci kot so karcinom embrionalni antigen, nevronska specifična enolaza, karcinomski antigen (CA 19-9, CA 125,

CA15-3, CA 72-4), prostatični specifični antigen in alfa- fetoprotein. Raziskava so opravili pri 1741 pacientih, katerih je bil serum shranjen pri temperaturi $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pacienti so imeli različne benigne ali maligne bolezni, vključena je bila tudi skupina zdravih ljudi. Vzorci krvi so bili odvzeti v aktivnem stadiju maligne bolezni, večina v času pred prvo terapijo, kirurškim posegom ali nastankom oddaljenih metastaz. Tumorski označevalec Cyfro 21-1 so določali z encimsko imunskimi tehnikami, pri čemer so uporabili dve monoklonalni specifični protitelesi (Ks 19.1 in BM 19.21). Različna monoklonalna protitelesa prepoznavajo različne epitope na površini humanega citokeratina 19. Za določanje Cyfre 21-1 sta najbolj specifični in občutljivi monoklonalni protitelesi Ks 19.1 in BM 19.21. Poleg dobre specifičnosti in občutljivosti je njuna dobra lastnost tudi ta, da ne reagirata navzkrižno z ostalimi citokeratini.

Tabela 3: Prikaz celotne skupine pacientov.

Skupina pacientov	število primerov	celotno število
1.) Referenčna skupina		
zdrave osebe	99	99
benigne bolezni		371
- pljuč	85	
- gastrointestinalnega trakta	106	
- rodil	56	
- sečil	54	
- dojk	70	
2.) Maligne bolezni		
rak pljuč		290
drobnocelični rak pljuč		
- drobnocelični karcinom	60	
nedrobnocelični rak pljuč		
- skvamoznocelični karcinom	88	
- adenokarcinom	85	
- velikocelični karcinom	29	
- raznoliki karcinom	10	
- relaps	18	
metastaze v pljučih	62	62
rak gastrointestinalnega trakta		370
- želodca	110	
- trebušne slinavke	83	
- debelega črevesa	64	
- požiralnika + analne odprtine	60+20	
- jeter + žolčevoda	19+14	
ginekološki raki		197
- jajčnikov	116	
- materničnega vratu	55	
- maternice + vulve	18+8	
rak dojke		188
- primarna diagnoza	97	
- oddaljene metastaze	72	
- lokalni relaps	19	
rak sečil		164
- prostate	75	
- sečnega mehurja + ledvic	71+18	
Skupni seštevek		1741

Določanje specifičnosti Cyfre 21-1

V krvi 99 klinično zdravih oseb je bila v 95 odstotkih določena koncentracija Cyfre 21-1 nižja od 4 kU/L (referenčna vrednost je do 4.0 kU/L), pri 4 odstotkih od 4 do 8 kU/L ter pri 1 odstotku 12 kU/L. Pri ugotavljanju organske specifičnosti so ugotovili, da Cyfra 21-1, ki nastaja zaradi benignih tvorbo, povzroča težave pri razlikovanju med benignimi in malignimi boleznimi.

Tabela 4: Razvrstitev koncentracij Cyfre 21-1 pri zdravih osebah in bolnikih z različnimi benignimi boleznimi.

Cyfra 21-1 (kU/L)	Zdrave osebe (%)	Benigne bolezni pljuč (%)	Gastrointestinalne benigne bolezni (%)	Ginekološke benigne bolezni (%)	Urološke benigne bolezni (%)	Benigne bolezni dojk (%)
0-4.0	95	88	72	80	63	93
4.1-8.3	4	8	21	16	26	6
8.4-15.4	1	3	3	4	9	1
15.5-100		1	2		2	
> 100			2			

Da bi lahko primerjali občutljivost Cyfre 21-1 z ustaljenimi tumorskimi označevalci, so prilagodili vse izračune na 95-odstotno specifičnost. Glede na celotno skupino pacientov vključno z zdravimi osebami in bolniki z benignimi boleznimi so določili referenčno vrednost pri 95-odstotni specifičnosti 8.1 kU/L. Če bi gledali skupino z benignimi boleznimi, bi bila referenčna vrednost za benigne bolezni pljuč 8.3 kU/L, za gastrointestinalne benigne bolezni 15.4 kU/L, za benigne bolezni dojk 11.6 kU/L, za ginekološke benigne bolezni 5.8 kU/L in za urološke benigne bolezni 11.6 kU/L.

Določanje občutljivosti Cyfre 21-1 v primerjavi z ustaljenimi označevalci

Da bi določili občutljivost Cyfre 21-1, so primerjali rezultate dobljene pri določanju Cyfre 21-1 z rezultati ustaljenih tumorskih označevalcev. Določanja so potekala v serumu pacientov z malignimi obolenji. Ugotovili so, da ima Cyfra 21-1 zelo visoko občutljivost pri raku pljuč.

Njena občutljivost je odvisna od histološkega tipa raka pljuč in od tega, če cyfro 21-1 določamo posamično ali jo kombiniramo z drugimi tumorskimi označevalci. Če jo določamo v kombinaciji, povečamo občutljivost.

Tabela 5: Diagnostična občutljivost Cyfre 21-1 in ostalih tumorskih označevalcev pri različnih vrstah tumorja.

OBČUTLJIVOST TUMORSKIH OZNAČEVALCEV (%)										
Tumor	CYFRA 21-1	CEA	SCC	NSE	CA 19-9	CA 72-4	CA 125	CA 15-3	AFP	PSA
Debelega črevesa	21	44			27					
Trebušne slinavke	34	28			75					
Želodca	22	23			25	52				
Jeter	16	8							80	
Dojk	26	26						42		
Jajčnikov	36	17				25	50			
Materničnega vratu	37	30	55							
Pljuč										
- drobnocelični rak pljuč	34			54						
- nedrobnocelični rak pljuč	49	29	17							
Prostate	16	17								84
Sečnega mehurja	23	30								

Na podlagi dobljenih podatkov so ugotovili, da je pri raku debelega črevesa CEA še vedno najboljši tumorski označevalec, saj je 44 odstotkov rezultatov resnično pozitivnih. CA 19-9 je imel visoko diagnostično občutljivost pri raku trebušne slinavke, CA 72-4 pa pri raku želodca. Pri primarnem jetrnem raku AFP ostaja vodilni tumorski označevalec z 80-odstotno občutljivostjo. CA 15-3 se je ponovno izkazal kot prva izbira pri raku dojk, CA 125 pa kot vodilni tumorski označevalec pri raku na jajčnikih. V primeru raka materničnega vratu SCC daje 55 odstotkov rezultatov resnično pozitivnih. Pri raku na prostati je imel tumorski označevalec PSA pričakovano zelo visoko 83-odstotno občutljivost. Pri drobnoceličnemu raku pljuč se je NSE, s 54-odstotno občutljivostjo izkazal kot označevalec prve izbire. V primeru velikoceličnega raka pljuč se je Cyfra 21-1 z 49-odstotno občutljivostjo pri razlikovanju med benignimi boleznimi pljuč in rakom pljuč izkazala bolje od CEA in SCC (18).

2.3.2. Raziskava o vlogi Cyfre 21-1 kot tumorskega označevalca pri raku sečnega mehurja

T. Morita je s sodelavci naredil raziskavo, da bi ovrednotili vlogo Cyfre 21-1 kot tumorskega označevalca pri raku sečnega mehurja. V raziskavi so uporabili celične linije raka sečnega mehurja JMSU1. V raziskavo je bilo vključenih 120 zdravih prostovoljcev, 20 pacientov z benignimi boleznimi raka sečnega mehurja (vključno z akutnimi cistitisi in sečnimi kamni), 12 pacientov s kronično ledvično odpovedjo in 117 pacientov s histološko potrjenim primarnim rakom sečnega mehurja. Koncentracije Cyfre 21-1 so bile izmerjene z encimsko imunsko sendvič metodo. Predklinične študije so pokazale, da pri testih in vitro JMSU1 proizvajajo in sproščajo Cyfro 21-1 v supernatant kulture, pri testih in vivo pa se Cyfra 21-1 sprošča v serum poskusne živali (miši). Referenčno vrednost 3.5 µg/L so določili z analizo serumov zdravih prostovoljcev. Z upoštevanjem te vrednosti so ugotovili, da je občutljivost pri benignih boleznih mehurja 0 odstotkov, pri kronični ledvični odpovedi 83 odstotkov in pri raku sečnega mehurja 41.9 odstotkov. Vrednosti Cyfre 21-1 so se znatno povečale pri napredni fazi tumorja ali če se je povečal njegov razred. Nadaljnje študije so pokazale, da se pri pacientih z napredovalim rakom mehurja koncentracije Cyfre 21-1 postopno povečujejo, medtem ko se pri bolnikih, ki so se odzvali na zdravljenje izrazito zmanjšujejo. Visoke serumske koncentracije Cyfre 21-1 so povezane z manjšimi možnostmi za preživetje. Na podlagi podatkov raziskave so zaključili, da je Cyfra 21-1 uporaben tumorski označevalec za spremljanje kliničnega poteka raka sečnega mehurja in za zagotavljanje prognostičnih podatkov (19).

2.3.3. Raziskava o uporabnosti Cyfre 21-1 za spremljanje uspešnosti zdravljenja pacientov z rakom sečnega mehurja

Andreadis C. je s sodelavci naredil raziskavo, katere namen je bil, da ugotovijo, če je Cyfra 21-1 uporaben tumorski označevalec za spremljanje uspešnosti zdravljenja pacientov z rakom sečnega mehurja. Koncentracije Cyfre 21-1 so v serumu 142 pacientov izmerili s pomočjo radioimunskih testov. 56 pacientov je imelo lokalno omejenega raka v kliničnem stadiju od I-III in 86 pacientov je imelo raka v stadiju IV z metastazami v bezgavkah ali oddaljenimi metastazami. V kontrolni skupini je bilo 33 zdravih prostovoljcev. V skupini 86 pacientov z metastatskimi boleznimi je 49 pacientov prejelo kemoterapijo kombinirano s platino. V serumu teh 49 pacientov so izmerili koncentracijo Cyfre 21-1 pred začetkom zdravljenja in po

dokumentaciji za odgovor. Pri pacientih z lokalno omejenim rakom so povišane koncentracije Cyfre 21-1 določili pri 7 odstotkih in pri pacientih z metastatskimi boleznimi pri 66 odstotkih. Korelacije med Cyfro 21-1 in med diferenciacijo tumorja ni bilo. Pacienti s povišanimi koncentracijami Cyfre 21-1 so pokazali statistično pomembno manjšo možnost preživetja. V skupini 49 pacientov z metastatskimi boleznimi, ki so prejeli kemoterapijo je bila koncentracija Cyfre 21-1 v serumu korelirana z odzivom na zdravljenje. Na podlagi podatkov raziskave so zaključili, da so koncentracije Cyfre 21-1 pri pacientih, ki imajo rak sečnega mehurja z oddaljenimi metastazami, bistveno povišane. Glede na koncentracije Cyfre 21-1 med kemoterapijo se zdi, da je potencialno občutljiv in koristen kazatelj za spremljanje odziva na zdravljenje (20).

2.4. Metode določanja tumorskih označevalcev

Tumorski označevalci se v telesnih tekočinah nahajajo v zelo majhnih koncentracijah, zato potrebujemo za njihovo dokazovanje visoko občutljive metode. Vse metode, ki jih uporabljamo, temeljijo na podobnem principu - določanju nastanka kompleksov med antigeni in protitelesi. Razlika med metodami je v spojini, ki je vezana na detekcijska protitelesa in načinu detekcije nastalih kompleksov (14).

2.4.1. Radioimunski testi (RIA)

Gre za ene najbolj vsestranskih in najobčutljivejših testov za merjenje antigenov in haptenov. Z radioimunskim testom lahko izmerimo zelo majhne koncentracije, zato je primeren za kvantitativno določanje zdravil, vitaminov, serumskih protiteles in hormonov. Pri tem testu uporabljamo radioaktivno označene antigene, protitelesa in haptene. Tekoča faza radioimunskega testa temelji na tekmovanju med nezaznamovanim in zaznamovanim antigenom za omejeno količino močno afinitetnih protiteles. Čim večja je količina nezaznamovanega antigena, tem več je izrinjenega zaznamovanega antigena z vezišč. Z merjenjem količine prostega zaznamovanega antigena v raztopini lahko določimo koncentracijo nezaznamovanega antigena.

2.4.2. Encimsko imunske tehnike (EIT)

Pri EIT je osnova pritrditvev različnih encimov na antigen ali protitelo, pri čemer se reaktivnost antigena ali protitelesa ne sme spremeniti. Encime, ki jih lahko uporabimo, so alkalna fosfataza, glikoza-6-fosfat-dehidrogenaza in peroksidaza. Njihovi substrati so lahko kromogeni, fluorogeni in luminiscenčne spojine. Ko encim in substrat reagirata, vidimo rezultate s prostim očesom ali s spektrofotometrom. Glede na to, ali je z encimom zaznamovan antigen ali protitelo, ločimo encimsko imunološke metode EIA, pri katerih je zaznamovan antigen in imunoencimometrijske metode IEMA, kjer je zaznamovano protitelo.

2.4.3. Luminiscenčne imunološke metode

Gre za kompetitivne metode, pri katerih je antigen zaznamovan npr. z luminolom. Po imunokemični reakciji antigena s protitelesom dodamo reagent, ki vsebuje vodikov peroksid in encim peroksidazo. Peroksidaza pretvori vodikov peroksid v vodo in povzroči oksidacijo luminola ter s tem spravi luminol v stanje povečane energije. Prek intermedijatorjev nato prehaja luminol v osnovno obliko in pri tem oddaja luminiscenco. Sproščeno svetlobno energijo merimo pri 425 nm. Kot označevalce lahko uporabimo še izoluminol in luciferin (9).

3. NAMEN DELA

Cyfra 21-1 spada med novejšje tumorske označevalce. V organizmu je normalno prisotna, pri določenih malignih in benignih boleznih pa se njena koncentracija lahko poviša. V svoji diplomski nalogi bi rada ugotovila, če se koncentracija Cyfre 21-1 v primeru raka sečnega mehurja poviša ali ostane nespremenjena.

Na urološki kliniki v Kliničnem centru v Ljubljani smo vzeli kri 15 pacientom, za katere smo sumili, da imajo raka na sečnem mehurju. V serumu teh vzorcev bomo določali koncentracijo Cyfre 21-1. V diplomski nalogi bomo statistično ovrednotili rezultate meritev koncentracij Cyfre 21-1 z namenom, da bi ugotovili klinično uporabnost Cyfra 21-1 v diagnostiki raka sečnega mehurja.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1. Definicija skupine

Preiskovana skupina je zajela 15 pacientov, od tega je bilo 5 žensk in 10 moških. Vsi pacienti so bili obravnavani na urološki kliniki v Kliničnem centru v Ljubljani zaradi suma, da imajo raka sečnega mehurja. V primeru štirih pacientov, ene ženske in treh moških, je bil rak citološko potrjen. Vrednosti tumorskega označevalca Cyfra 21-1 pri teh pacientih so bile v dveh primerih pričakovano močno povišane, pri drugih dveh primerih pa nepričakovano normalne. Pri 11 pacientih, ki niso imeli raka sečnega mehurja, so bile vrednosti normalne.

4.2. Natančen opis metode

Cyfra 21-1 EIT (encimsko imunski test) je ime metode, s katero določamo tumorski označevalec Cyfro 21-1. Metoda Cyfra 21-1 EIT temelji na uporabi dveh monoklonalnih protiteles BM 19.21 in Ks 19.1, ki sta specifični za fragment citokeratina 19.

4.2.1. Princip metode Cyfra 21-1 EIT

Cyfra 21-1 EIT je nekompetitivna encimska metoda, ki temelji na dveh specifičnih monoklonalnih protitelesih usmerjenih proti dvema različnima antigenskima determinantama Cyfre 21-1. Kalibratorje, kontrole in neznane vzorce inkubiramo skupaj z monoklonalnimi protitelesi, na katera je vezan biotin ter z monoklonalnimi protitelesi označenimi s hrenovo peroksidazo (HRP), ki se nahajajo na mikrotiterski plošči prevlečeni s streptavidinom. Po inkubaciji mikrotiterske plošče spiramo ter dodamo v vsako vdolbinico puferski substrat/kromogeni reagent (vodikov peroksid in 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidin), da se encimska reakcija lahko nadaljuje. Če je v vzorcu prisoten antigen, med potekom encimske reakcije opazimo modro obarvanje. Intenzivnost obarvanja je proporcionalna količini Cyfre 21-1 v vzorcu. Izmerimo jo na mikrotiterski plošči s spektrofotometrom pri 620 nm (druga možnost je merjenje intenzivnosti po dodatku Stop-raztopine pri 405 nm). Za vsako metodo posebej moramo narediti umeritveno krivuljo tako, da izmerimo absorbanco za vsako

koncentracijo kalibratorja. Iz teh podatkov narišemo umeritveno krivuljo, na kateri lahko odčitavamo rezultate vzorcev z neznanimi koncentracijami Cyfre 21-1.

4.2.2. Reagenti

Streptavidinska mikroplošča:

Vsebuje 12×8 odlomljivih vdolbinic, ki so prevlečene s streptavidinom. Po odprtju moramo neuporabljene trakove takoj vrniti v aluminijasto vrečko, da ostanejo suhi.

Kalibrator Cyfra 21-1 A:

Je slana raztopina fosfanega pufra, ki vsebuje goveji serumski albumin. Goveji serumski albumin je inertni rumeno obarvani, nekisli protimikrobni konzervans že pripravljen za uporabo. Uporablja se ga za redčenje vzorca.

Kalibratorji Cyfra 21-1 B, C, D, E, F:

So liofilizirane slane raztopine fosfatnega pufra, ki vsebujejo goveji serumski albumin. V njih se nahaja antigen Cyfra 21-1. Pred uporabo jih moramo pripraviti tako, da jih pomešamo z destilirano ali deionizirano vodo.

Kontrola Cyfra 21-1 1 in 2:

Sta liofilizirani kontroli, ki v matriksu humanega seruma in nekislem protimikrobnem konzervansu vsebujeta antigen Cyfro 21-1. Pred uporabo ju moramo pripraviti tako, da ju pomešamo z destilirano ali deionizirano vodo.

Biotin Anti-Cyfra 21-1:

Je raztopina monoklonalnih protiteles pridobljenih iz miši. Poleg protiteles vsebuje slano raztopino tris-HCl pufra (pH 7.2), goveji serumski albumin, blokirni agent, inertni modro obarvani detergent in protimikrobni konzervans. Pred uporabo ga moramo pomešati s Konjugatom Anti-Cyfra 21-1 (sledilnikom).

Konjugat Anti-Cyfra 21-1:

Je raztopina monoklonalnih protiteles pridobljenih iz miši, na katera je vezana hrenova peroksidaza (HRP). Poleg protiteles vsebuje še nekisli protimikrobni konzervans. Pred uporabo ga moramo pomešati z Biotinom Anti-Cyfra 21-1.

TMB HRP-substrat:

Vsebuje pufer vodikov peroksid in 3, 3', 5, 5' tetra-metilbenzidin (TMB). Je pripravljen za uporabo.

Stop-raztopina:

Vsebuje 0.12 M klorovodikovo kislino in je pripravljena za uporabo.

Spiralni pufer:

Je slana raztopina tris-HCl pufera z Tween 20. Vsebuje konzervans Germall II. Pred uporabo ga moramo 25-krat razredčiti z destilirano ali deionizirano vodo.

4.2.3. Priprava reagentov

Priprava Cyfra 21-1 kalibratorja

Vsaki viali dodamo natančno 1.0 mL destilirane vode in pustimo stati vsaj 15 minut, da se rekonstituira. Pred uporabo nežno premešamo z električnim vibrirajočimi mešalnikom (5 sekund).

OPOMBA: Koncentracija posameznega kalibratorja je napisana na njegovi etiketi in jo potrebujemo za izračun rezultatov.

Priprava Cyfra 21-1 kontrole

Vsaki viali dodamo natančno 1.0 mL destilirane vode in pustimo stati vsaj 15 minut, da se rekonstituira. Pred uporabo nežno premešamo z električnim vibrirajočim mešalnikom (5 sekund).

OPOMBA: Območje koncentracije posamezne kontrole je napisano na njeni etiketi.

Priprava spiralne raztopine

50 mL spiralnega koncentrata vlijemo v čisto posodo in 25-krat razredčimo tako, da dodamo 1200 mL destilirane ali deionizirane vode. S tem dobimo pufer spiralne raztopine.

Priprava raztopine s protitelesi

Pripravimo potrebno količino raztopine s protitelesi tako, da zmešamo 50 µL Konjugata Anti-Cyfra 21-1 z 1.0 mL Biotina Anti-Cyfra 21-1 na en trak mikroplošče (glej spodaj).

Tabela 6: Prikazuje potrebno količino Konjugata Anti-Cyfra 21-1 in Biotina Anti-Cyfra 21-1 glede na število trakov, ki jih potrebujemo.

Število trakov	Konjugat Anti-Cyfra 21-1 (μL)	Biotin Anti-Cyfra 21-1 (mL)
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

4.2.4. Zbiranje vzorcev in ravnanje z njimi

Cyfra 21-1 EIT izvajamo v serumu. Kri odvzamemo z vensko punkcijo in ločimo serum s centrifugiranjem na 2000 obratih 5 minut. Vzorce lahko shranjujemo pri temperaturi od 2 do 8°C en dan, če pa želimo vzorce shraniti za daljše obdobje, jih shranjujemo pri temperaturi -40 °C ali manj. Ponavljajočemu se zmrzovanju in odtaljevanju vzorcev se moramo izogniti. Pred začetkom analize morajo biti vzorci ogreti na sobno temperaturo.

4.2.5. Material

- stresalnik za mikroplošče,
- pralna naprava za mikroplošče,
- spektrofotometer za mikroplošče,
- precizne pipete,
- destilirana ali deionizirana voda.

4.2.6. Postopek Cyfra 21-1 EIT

1.) Najprej si pripravimo Cyfra 21-1 kalibratorje, kontroli 1 in 2, spiralno raztopino in raztopino protiteles. Pomembno je, da pri delu uporabljamo čiste posode in da natančno sledimo navodilom.

2.) Nato prenesemo potrebno število mikroploščnih trakov v okvir (neuporabljene trakove takoj vrnemo v aluminijasto folijo, da ostanejo suhi) in vsak trak 1x speremo s spiralno raztopino. Pri tem moramo paziti, da spiramo tolikšno število trakov, kot jih lahko speremo v 30 minutah.

3.) Pred uporabo moramo vzorce dobro premešati. Lahko jih mešamo na valjastem mešalniku 1 minuto pri največji hitrosti ali z električnim vibrirajočim mešalnikom z najvišjo hitrostjo 5 sekund. Nato s 50 μ L pipeto odpipetiramo Cyfra 21-1 kalibratorje (A, B, C, D, E in F), kontroli 1 in 2 ter neznane vzorce v vdolbinice trakov po sledeči shemi:

Tabela 7: Prikazuje vrstni red in mesto na mikroplošči, kamor moramo odpipetirati kalibratorje, kontrole in vzorce.

	1	2	3	4	5
A	Kalibrator A	Kalibrator E	Vzorec 1		
B	Kalibrator A	Kalibrator E	Vzorec 1		
C	Kalibrator B	Kalibrator F	Vzorec 2		
D	Kalibrator B	Kalibrator F	Vzorec 2		
E	Kalibrator C	Kontrola 1	Vzorec 3		
F	Kalibrator C	Kontrola 1	Vzorec 3		
G	Kalibrator D	Kontrola 2			
H	Kalibrator D	Kontrola 2			

4.) V vsako vdolbinico dodamo s precizno 100 μ L pipeto 100 μ L raztopine s protitelesi. Zaradi možnega prenosa moramo paziti, da se s konico pipete ne dotaknemo površine tekočine.

5.) Trakove inkubirano 1 uro (± 5 minut) na sobni temperaturi ob konstantnem tresenju stresalnika.

6.) Po končani inkubaciji iz vsake vdolbinice odpipetiramo odvečno tekočino in splaknemo 6-krat.

7.) V vsako vdolbinico dodamo 100 μ L TMB HRP-substrata na enak način, kot smo to storili pri točki 4. TMB substrat moramo dodati kar se da najhitreje, saj med dodajanjem TMB substrata v prvo vdolbinico in v zadnjo ne sme preteči več kot 5 min.

8.) Inkubiramo 30 minut (\pm 5minut) na sobni temperaturi ob konstantnem tresenju. Izogibati se moramo izpostavljanju trakov direktni sončni svetlobi.

9.) Po končani inkubaciji takoj odčitamo absorbanco pri 620 nm s spektrofotometrom za mikroplošče.

V primeru, če laboratorij nima spektrofotometra za mikroplošče, ki bi bil sposoben odčitavanja absorbance pri 620 nm se postopek pri 9. točki spremeni:

Spremenjena točka 9.) Dodamo 100 μ l Stop-raztopine in po 15 minutah odčitamo absorbanco pri 405 nm s spektrofotometrom za mikroplošče.

5. REZULTATI

15 pacientom, pri katerih je bil prisoten sum na raka sečnega mehurja in ki so jim na urološki kliniki opravili pregled, cistoskopijo in citologijo na odvzetem tkivu mehurja, smo v serumu določali koncentracijo Cyfre 21-1. Referenčna vrednost je bila 2.82 $\mu\text{g/L}$. Dobljene vrednosti, ki so nižje od referenčne vrednosti, pomenijo negativen rezultat, višje vrednosti pa pozitiven rezultat.

Tabela 8: Prikaz vrednosti koncentracij Cyfre 21-1 v serumu, spola, letnice rojstva, rezultat cistoskopije in citologije ter status pacientov. (Pri cistoskopiji 0 pomeni, da pri pregledu notranjosti mehurja niso opazili malignega tumorja, 1 pa pomeni, da so ga opazili. Pri citologiji 0 pomeni, da pri pregledu tkivnega vzorca sečnega mehurja niso opazili rakavih celic, 1 pa pomeni, da so jih.)

	Pacient	Cyfra 21-1 $\mu\text{g/L}$	Spol	Letnica rojstva	Cistoskopija	Citologija	Status
1	Pacient 1	0,396	Ženska	1954	0	0	Postoperativna terapija
2	Pacient 2	0,720	Moški	1929	0	0	Postoperativna terapija
3	Pacient 3	0,277	Moški	1930	1	1	Rak
4	Pacient 4	0,098	Moški	1929	0	0	Postoperativna terapija
5	Pacient 5	0,472	Ženska	1950	0	0	Postoperativna terapija
6	Pacient 6	1,176	Ženska	1939	0	0	Postoperativna terapija
7	Pacient 7	1,391	Moški	1949	1	0	Postoperativna terapija
8	Pacient 8	0,686	Ženska	1930	0	0	Postoperativna terapija
9	Pacient 9	2,426	Moški	1930	1	1	Rak

10	Pacient 10	0,581	Moški	1971	0	0	Postoperativna terapija
11	Pacient 11	1,630	Moški	1950	1	0	Postoperativna terapija
12	Pacient 12	0,581	Moški	1929	0	0	Postoperativna terapija
13	Pacient 13	1,082	Moški	1950	1	0	Postoperativna terapija
14	Pacient 14	75,500	Ženska	1950	0	1	Rak
15	Pacient 15	9,752	Moški	1951	1	1	Rak

5.1. Izračun občutljivosti in specifičnosti Cyfre 21-1

Občutljivost izračunamo po formuli kjer število pacientov z rakom sečnega mehurja s povišano koncentracijo Cyfre 21-1 (A) delimo s seštevkom števil pacientov z rakom mehurja, ki imajo povišano vrednost Cyfre 21-1 (A) in tistih, ki imajo normalno vrednost Cyfre 21-1 (B).

$$OBČUTLJIVOST = A/(A+B) = 2/(2+2) = 2/4 = 0.50 \rightarrow 50 \text{ odstotna občutljivost}$$

Cyfra 21-1 ima v naši raziskavi 50-odstotno občutljivost, kar je zadovoljivo, ni pa najboljše. To pomeni, da je koncentracija Cyfre 21-1 pri polovici pacientov z rakom sečnega mehurja povišana, pri drugi polovici pa ne, torej je polovica rezultatov lažno negativnih.

Specifičnost izračunamo po formuli, kjer število pacientov brez raka sečnega mehurja z normalno vrednostjo Cyfre 21-1 (D) delimo s seštevkom števil pacientov brez raka mehurja, ki imajo povišano vrednost Cyfre 21-1 (C) in tistih, ki imajo normalno vrednost Cyfre 21-1 (D).

$$SPECIFIČNOST = D/(C+D) = 11/(0+11) = 11/11 = 1.0 \rightarrow 100\text{-odstotna specifičnost}$$

Cyfra 21-1 se je v naši raziskavi izkazala za 100-odstotno specifičen tumorski označevalec za raka na sečnem mehurju. To pomeni, da ne daje lažno pozitivnih rezultatov, torej je pri vseh pacientih, ki nimajo raka sečnega mehurja, koncentracija Cyfre 21-1 normalna.

5.2. Primerjava korelacije z diagnozo pri določanju Cyfre 21-1, pri cistoskopiji in citologiji

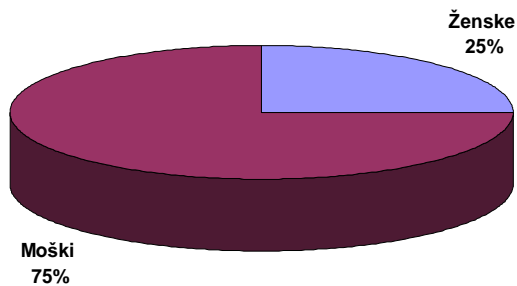
Tabela 9: Prikaz rezultatov dobljenih pri določanju Cyfre 21-1, pri citologiji in cistoskopiji.

	Lažno pozitivni	Resnično pozitivni	Lažno negativni	Resnično negativni
Cyfra 21-1	0	2	2	11
Citologija	0	4	0	11
Cistoskopija	3	3	1	8

Iz tabele 9 je razvidno, da pri citologiji ni nobenih lažno pozitivnih niti lažno negativnih rezultatov, zato lahko sklepamo, da je citologija v najboljši korelaciji z diagnozo. Cistoskopija je v malo slabši korelaciji z diagnozo kot citologija, saj se pri njej pojavljajo 3 lažno pozitivni rezultati in 1 lažno negativen. Pri Cyfri 21-1 ni lažno pozitivnih rezultatov, sta pa 2 lažno negativna, vendar lahko kljub temu rečemo, da je Cyfra 21-1 v dokaj dobri korelaciji z diagnozo.

5.3. Število obolelih za rakom sečnega mehurja glede na spol

Iz podatkov v tabeli 8 je razvidno, da je več moških pacientov z rakom sečnega mehurja kot žensk, kar se ujema s statistiko, da za rakom mehurja pogosteje zbolevarajo moški kot ženske. V skupini 4 bolnikov obolelih za rakom sečnega mehurja so 3 moški in 1 ženska.

Število obolelih za rakom sečnega mehurja glede na spol

Graf 2: Razmerje med številom pacientov z rakom sečnega mehurja glede na spol.

5.4. Starost pacientov obolelih za rakom sečnega mehurja

Starost pacientov, pri katerih smo sumili na raka sečnega mehurja, je od 38 do 80 let. Pacienti oboleli za rakom na mehurju so stari 58 let, 59 let ter dva 79 let. Po statistiki se rak sečnega mehurja najpogosteje pojavlja v starosti 50 in 70 let.

6. RAZPRAVA

Citokeratini so snovi, ki niso naključno razporejene v različnih epitelijih, ampak so značilne za določene vrste epitelijev in njihove diferenciacije. Njihovo izražanje se pri malignih transformacijah epiteljskih celic ne izgubi, zato smo želeli ugotoviti, kakšno vlogo ima fragment citokeratina 19 pri raku sečnega mehurja.

Cyfra 21-1 je tako kot mnogi drugi tumorski označevalci organsko nespecifična in je normalno prisotna v različnih tkivih. Znano je, da se njene vrednosti pri določenih vrstah raka povečajo, zato nas je zanimal njen klinični pomen določanja pri raku sečnega mehurja. V skupini 15 pacientov so imeli 4 potrjeno diagnozo raka sečnega mehurja. Ugotovili smo, da so bile vrednosti Cyfre 21-1 pri 2 pacientih (pacienta 14 in 15) z rakom sečnega mehurja povišane in pri dveh normalne (pacienta 3 in 9). Iz podanih rezultatov smo izračunali, da ima Cyfra 21-1 50-odstotno občutljivost, kar je zadovoljivo, ni pa najboljše. Pri vseh preostalih 11 pacientih, ki nimajo raka mehurja in so na terapiji, pa so bile koncentracije Cyfre 21-1 normalne. To pomeni, da ima Cyfra 21-1 100-odstotno specifičnost, kar je zelo zadovoljivo. Če upoštevamo izračunane vrednosti občutljivosti in specifičnosti lahko sklepamo, da je Cyfra 21-1 dokaj dober tumorski označevalec za določanje pri raku mehurja. Vendar se moramo zavedati, da ena sama določitev nima velikega pomena. Natančnejše podatke o klinični uporabnosti Cyfre 21-1 pri raku sečnega mehurja bi dobili, če bi določitve opravili pri vsakem pacientu večkrat in v različnih stadijih njegove bolezni. S tem bi ugotovili, ali se koncentracije spreminjajo v skladu z idealnim tumorskim označevalcem ali ne. Pri idealnem tumorskem označevalcu je koncentracija pri zdravih osebah nižja od referenčne vrednosti. Pri raku "in situ" se koncentracija rahlo poveša, pri lokaliziranem raku se koncentracija že precej poveša in pri razširjenem raku (metastaze) se koncentracija močno poveša. Po kirurški odstranitvi (uspešni terapiji) začne koncentracija naglo padati tako, da je v stanju remisije normalna. Če pa pride do ponovitve bolezni, se cikel zviševanja in nižanja koncentracije tumorskega označevalca začne ponovno. Ker smo mi določitve koncentracij Cyfre 21-1 opravili pri vsakem pacientu le enkrat, ne moremo natančno oceniti, če se koncentracije spreminjajo v skladu z idealnim tumorskim označevalcem ali ne. Težava naše raziskave je tudi v majhnem številu pacientov, zaradi česar so lahko nekateri dobljeni rezultati, sploh za občutljivost in specifičnost, drugačni kot bi bili pri večji skupini pacientov. Ker gre za majhno skupino ne moremo biti popolnoma prepričani, ali je reprezentativna ali ne. Ponavadi velja, da

večja kot je skupina pacientov (vzorec), večja je verjetnost, da je bolj reprezentativna in posledično so tudi dobljeni rezultati bolj točni. Če upoštevamo naše rezultate, pridemo do ugotovitve, da ima Cyfra 21-1 najbolj pomembno vlogo pri spremljanju uspešnosti operacije (terapije). Pri vseh 11 pacientih, ki so bili v stanju po operaciji, so bile koncentracije Cyfre 21-1 normalne, to pomeni, da je bila operacija uspešna. V primeru, da operacija ne bi bila uspešna, torej rak ne bi bil v celoti odstranjen, koncentracija Cyfre 21-1 ne bi bila normalna. Bila bi povišana, saj bi rak še vedno vplival na povečano izločanje Cyfre 21-1 iz urotelijskih celic sečnega mehurja. Določanje Cyfre 21-1 ima določeno vlogo tudi pri spremljanju širjenja raka sečnega mehurja. V naši raziskavi smo imeli 4 paciente z rakom sečnega mehurja. V primeru dveh pacientov, ki sta imela raka v začetnem stadiju, so bile koncentracije Cyfre 21-1 normalne, pri drugih dveh pacientih z napredovalim rakom pa močno povišane. Iz tega lahko sklepamo, da je določanje Cyfre 21-1 klinično pomembno le pri pacientih z napredovalo obliko raka, ne pa tudi pri tistih z rakom v začetnem stadiju. Naši rezultati se ujemajo z ugotovitvami, ki so jih Y. Senga, G. Kimura, T. Hattori in K. Yoshida objavili v svoji študiji, kjer so klinično ovrednotili Cyfro 21-1 v serumu in urinu pacientov z rakom sečnega mehurja. Koncentracijo Cyfre 21-1 so določali z encimsko imunskim testom (sendvič metoda). V študiji je sodelovalo 278 pacientov, od tega jih je 58 imelo raka sečnega mehurja in 220 jih je imelo druge urološke bolezni oziroma so bili zdravi. Skupino 220 pacientov so razdelili v pet skupin (pacienti s cistitisom, z benigno hiperplazijo prostate, s sečnimi kamni, z odpovedjo ledvic in kontrolna skupina zdravih oseb). Skupini 58 pacientov so koncentracijo Cyfre 21-1 določevali po transuretralni resekciji raka mehurja. Po opravljenih meritvah so ugotovili, da so serumske in urinske vrednosti Cyfre 21-1 pri skupini pacientov z rakom mehurja opazno višje kot pri kateri koli podskupini 220 pacientov. Za urinske vrednosti Cyfre 21-1 pri pacientih z rakom mehurja so ugotovili, da se ne razlikujejo veliko od vrednosti podskupine pacientov s cistitisom. Urinske vrednosti so bile v veliki korelaciji z volumnom tumorja in so bile opazno pomembnejše od citološkega pregleda urina za odkrivanje raka sečnega mehurja stopnje 1 in 2. Pri urinskih vrednostih Cyfre 21-1 so opazili tudi, da so se zmanjševale v odvisnosti od časa, ki je pretekel od transuretralne resekcije raka mehurja. Za serumske vrednosti Cyfre 21-1 so ugotovili, da so bile pri skupini pacientov z rakom mehurja opazno višje kot pri pacientih z lokalno napredovalo stopnjo bolezni in pri tistih z metastazami. Iz dobljenih rezultatov so prišli do sklepa, da so vrednosti urinske Cyfre 21-1 uporabne kot tumorski označevalec pri presejalnih testih za raka na mehurju, serumske vrednosti Cyfre 21-1 pa so lahko koristne kot tumorski označevalec pri napredovalem raku mehurja (21).

Če primerjamo našo raziskavo z raziskavo Y. Senga in njegovih sodelavcev vidimo, da je bila njihova skupina pacientov z rakom mehurja veliko večja, vendar so prav tako prišli do ugotovitve, da nam serumske vrednosti Cyfre 21-1 pomagajo le pri napredovali obliki raka mehurja. O občutljivosti, specifičnosti in spremljanju uspešnosti operacije žal ne moremo delati primerjav. Prav tako ne moremo delati primerjav glede urinskih vrednosti Cyfre 21-1, saj smo v naši raziskavi določali samo serumske vrednosti.

7. SKLEP

Namen moje diplomske naloge je bil, da statistično ovrednotimo rezultate meritev koncentracij Cyfre 21-1 in ugotovimo, kakšen je klinični pomen določanja Cyfre 21-1 v diagnostiki raka sečnega mehurja.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo naslednje:

- Tumorski označevalec Cyfra 21-1 ima pri raku sečnega mehurja 50-odstotno občutljivost in 100-odstotno specifičnost. Zaradi nekoliko slabše občutljivosti Cyfre 21-1 se pri postavitvi diagnoze na njeno vrednost v serumu ne moremo popolnoma zanašati in na podlagi teh rezultatov potrditi diagnozo.
- Cyfra 21-1 ima zelo pomembno vlogo pri spremljanju uspešnosti terapije. Pri vseh 11 pacientih, ki so bili na terapiji in niso imeli raka, so bile vrednosti Cyfre 21-1 pod referenčno vrednostjo.
- Cyfra 21-1 ima določeno vlogo tudi pri spremljanju razširjenosti raka sečnega mehurja. Pri pacientih z rakom mehurja v začetnem stadiju so bile koncentracije Cyfre 21-1 normalne, pri pacientih z napredovalo obliko bolezni pa močno povišane. Iz tega sklepamo, da je Cyfra 21-1 primerna le za spremljanje pacientov z napredovalim rakom mehurja.

8. LITERATURA

- (1) Pintar L.: Človeško telo, Ljubljana: Mladinska knjiga, 1994: 42-3
- (2) Fraile Ovejero A., Negri M.: Naravoslovni atlas fiziologija človeka, Ljubljana: Mladinska knjiga, 1993: 40-45
- (3) Brzin B.: Kako deluje? Človek in njegove bolezni, Ljubljana: Tehniška založba Slovenije, 1991: 204-17
- (4) Štiblar Martinčič D., Cör A., Cvetko E., Marš T., Legan M.: Anatomija, Histologija, Fiziologija 2. izdaja, Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, 2008: 151-157
- (5) Miksić K., Flis V.: Izbrana poglavja iz kirurgije, Maribor: Obzorja, 2003: 231-46
- (6) Kocijančič A., Mrevlje F.: Interna medicina, Ljubljana: Mladinska knjiga 1998, 879-94
- (7) Hickin L.. Vodnik za vsako žensko,, 2002: 188-189
- (8) Dollinger M., Roenbaum E. H., Cable G.: Življenje z rakom, Ljubljana: Tehniška založba, 1995: 13-22 in 517-26
- (9) Osredkar J.: Izbrana poglavja iz klinične biokemije, Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2008: 92-105
- (10) Fras A. P.: Onkologija, Ljubljana, 1994: 269-73
- (11) Irena: Kako živeti z rakom- Rak mehurja, 2003
<http://med.over.net/forum5/read.php?26,1149371>
- (12) Sedmak B.: Maligni tumorji mehurja, Zdravstveni vestnik 2003; 72: 27-31
- (13) Smrkolj V.: Kirurgija, Ljubljana: Sledi 1995, 121-22
- (14) Novaković S. : Tumorski označevalci v klinični onkologiji
<http://www.onko-i.si/uploads/articles/1-2000-novakovic.pdf>
- (15) Novaković S. : Pregled pomembnejših tumorskih označevalcev v klinični onkologiji
http://www.onko-i.si/uploads/Publikacije_pdf/Pregled_pomembnejših_tumorskih_oznacevalcev_v_klinicni_onkologiji.pdf
- (16) Jovanović I., Milosaljević T., Micev M., Bjelović M., Peško P.: Imunofenotipske osobine Barrettovog ezofagusa i intestinalne metaplazije epitela kardije, antruma i korpusa želuca 2003, 33-44
- (17)
http://www.chronolab.info/index.php?option=com_analiza&Itemid=50&id=62&task=analiza_8

- (18) Wieskopf B., Demangeat C.: Cyfra 21-1 as a Biologic Marker of Non-small Cell Lung Cancer, *Chest* 1995, 108; 163-9
- (19) Morita T., Kikuchi T., Hashimoto S., Kobayashi Y., Tokue A.: Cytokeratin-19 fragment (CYFRA 21-1) in bladder cancer, *European urology* 1997: 237-44
- (20) Andreadis C., Touloupidis S., Galaktidou G., Kortsaris A.H., Boutis A., Mouratidou D.: Serum Cyfra 21-1 in patients with invasive bladder cancer and its relevance as a tumor marker during chemotherapy, *The Journal of urology* november 2005 :1771-6
- (21) Senga Y., Kimura G., Hattori T., Yoshida K.: Clinical evaluation of soluble cytokeratin 19 fragments (CYFRA 21-1) in serum and urine of patients with bladder cancer, *Urology* 1996: 703-10