

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**KLINIČNI POMEN DOLOČANJA
TUMORSKEGA OZNAČEVALCA NMP22 PRI
RAKU SEČNEGA MEHURJA**

**CLINICAL APPLICATION OF NMP22 IN THE MANAGMENT OF
BLADDER CANCER**

ANDRIJANA TRIPUNOVIĆ

Ljubljana, 2009

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila svojemu mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, ki me je s svojimi napotki in vzpodbudami vodil k nastanku diplomske naloge.

Iskrena hvala pa gre tudi moji družini, predvsem pa moji sestri Marijani ter Mladenu, ki sta mi brezpogojno pomagala in mi stala ob strani pri ustvarjanju mojega dela.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom **prof. dr. Joška Osredkarja**.

Ljubljana, 2009

Andrijana Tripunović

ČLANI KOMISIJE:

Mentor: prof. dr. Joško Osredkar, mag. far

Predsednik dipl. komisije: izr. prof. dr. Vojko Kmetec, mag. far.

Član dip. komisije: doc. dr. Robert Roškar, mag. far.

POVZETEK

Rak sečnega mehurja je bolezen, katere incidenca po svetu, pa tudi v Sloveniji narašča. Posledična rast bolezni raka sečnega mehurja je predvsem zaradi velikega vpliva nevarnih dejavnikov okolja v katerem živimo. Vsekakor se moramo zavedati, da so vzročni dejavniki za nastanek v prvi stopnji povezani z načinom življenja. Čisto v osnovnem primeru lahko povemo, da kadilci zbolijo za rakom sečnega mehurja dvakrat pogosteje kot nekadilci. Kot druga ugotovitev ki sem jo na začetku omenila, je v veliki meri povezana z izpostavljenostjo kemičnih karcinogenov na delovnem mestu, npr. v pleskarskih barvah, barvah za laseh... Najbolj so izpostavljeni pri tej bolezni starejši moški med 60. in 70. letom starosti, katerih obolevanje zanesljivo in strmo narašča.

Zgodnje odkrivanje ter postavljanje diagnostike, omogoča uspešno zdravljenje in tudi boljšo prognozo. Rak sečnega mehurja predstavlja 7% vseh novo odkritih rakavih bolezni pri moških in pri ženskah kar 3%. Vsekakor pa moramo biti pazljivi na zgodnje znake, ki so skromni, včasih podobni vnetju mehurja.

Tumorski označevalec NMP22 je pomemben in primeren za odkrivanje raka na sečnem mehurju. Je protitelo proteina NuMA (nuklearni mitotični operativni encim). Za ta encim je značilno, da se pojavlja v malignih tkivih, kar v desetkratnih vrednostih kot pri zdravih. Raziskave kažejo, da je NMP22 metoda pomembna in z njo lahko v določenih primerih odkrijemo začetne stopnje bolezni, ki so velikega in poglobitega pomena pri nadaljnjem zdravljenju. Uporaba kombiniranega diagnosticiranja tumorskega označevalca z ostalimi tehnikami, je priporočilo za učinkovito in zgodnje odkrivanje tega.

Raziskave kažejo, da se s pomočjo določanja NMP22 povečuje natančnost določanja raka na sečnem mehurju, ter dobljeni rezultati, ki smo jih primerjali s cistoskopskimi so podali zelo visoko občutljivost kot tudi specifičnost. Pomeni da, se nanje lahko zanesemo, kar pa je bistvenega pomena, je to, da lahko s to preiskavo zaznamo tudi začetne stopnje bolezni, ki jih z drugimi metodami ne bi zaznali. Zato je potrebno še enkrat poudariti, da z uporabo kombiniranega diagnosticiranja tumorskega označevalca z ostalimi tehnikami odkrivanja raka najboljše priporočilo za zgodnje ter učinkovito odkrivanje te bolezni.

SEZNAM OKRAJŠAV

AF	- alkalna fosfataza
AFP	- alfa-fetoprotein
BHP	- benigna hiperplazija prostate ali benigno povečana prostata
CA 15-3	- karcinom antigen 15/3
CA 19-9	- karcinom antigen 19/9
CEA	- karcinomembrionalni antigen
ELISA	- encimsko-immunski test (Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay)
MCA	- mucinski karcinom antigen
NMP22	- tumorski označevalec (Nuclear matrix protein 22)
NuMA	- nuklearni mitotični operativni encim
PASM	- prekomerno aktivni sečni mehur
PSA	- za prostatu specifični antigen
P	- protitelo
POC	- preiskavo opravimo ob preiskovancu in ne v laboratoriju (Point of Care)
RIA	- radioimunski test (Radio-Immuno-Assay)
TCC	- tumor prehodnega epitela (Transitional cell carcinoma)
TPA	- tkivni polipeptidni antigen
TNM	- tumor, noduli-limfni vozlički, metastaze
UZ	- ultrazvok
WHO	- Svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organization)

KAZALO

1	UVOD.....	1
1.1	Rak sečnega mehurja	1
1.1.1	Zgradba (anatomija) sečnega mehurja.....	1
1.1.2	Bolezni urinarnega trakta.....	2
1.1.3	Pogostost raka sečnega mehurja.....	8
1.1.4	Etiologija	8
1.1.5	Nastanek in razvoj rakave bolezni.....	10
1.1.6	Znaki bolezni	10
1.1.7	Diagnoza raka sečnega mehurja	11
1.1.8	Zdravljenje.....	13
1.2	Klasifikacija.....	15
1.2.1	Klasifikacija tumorjev sečnega mehurja po WHO	15
1.2.2	Klasifikacija TNM raka mehurja	16
1.3	Tumorski označevalci	16
1.3.1	Določanje tumorskih označevalcev	17
1.3.2	Lastnosti idealnega tumorskega označevalca	18
1.3.3	Biološki faktorji, ki lahko vplivajo na serumske koncentracije tumorskih označevalcev.....	18
1.3.4	Kdaj določiti tumorski označevalec	19
1.3.5	Delitev tumorskih označevalcev.....	19
1.3.6	Tumorski označevalec NMP22	21
2	NAMEN NALOGE	22
3	EKSPERIMENTALNI DEL	23
3.1	Opis skupine	23
3.2	Uporabljene metode.....	23
3.2.1	NMP22 BladderChek test.....	24
3.2.2	Princip določanja encima osnovan na direktni (sendvič) ELISI	25
3.2.3	Princip ELISA test.....	26
3.2.4	Potek analize.....	26
3.2.5	Vsebnost testnih kompletov	27
3.2.6	Postopek določanja.....	28
4	REZULTATI	29
4.1	Razprava rezultatov	29
4.1.1	Izračun občutljivosti in specifičnosti uporabljenih diagnostičnih testov.....	31
4.1.2	Ujemanje rezultatov ELISA testa s cistoskopijo	33
4.1.3	Ujemanje rezultatov BladderChek s cistoskopijo.....	34
5	RAZPRAVA.....	36
6	SKLEP.....	42
7	LITERATURA	43

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz mehurja v praznem in polnem stanju	1
Slika 2: Prikaz mehurja s razvitim PASM simptomom.....	3
Slika 3: Primer sečnega kamna.....	5
Slika 4: Prostata	5
Slika 5: Prikaz transrektalnega ultrazvoka	7
Slika 6: Rak sečnega mehurja (bladder - sečni mehur)	9
Slika 7: Cistoskopski pregled	12
Slika 8: Cistoskop.....	12
Slika 9: Opis ne-invazivnega postopka BladderChek testa	24
Slika 10: Princip "sendvič" ELISA	25

KAZALO TABEL

Tabela 1: Razporeditev rezul. ELISA testa, BladderChek-a ter cistoskopije.....	32
Tabela 2: Prikaz pozitivnih in negativnih rezultatov, ki jih dobimo s pomočjo treh opravljenih metodah	33
Tabela 3: Razporeditev rezultatov treh uporabljenih metod	33
Tabela 4: Prikazuje odstotke specifičnosti ter občutljivosti posameznih metod.....	39

KAZALO GRAFOV

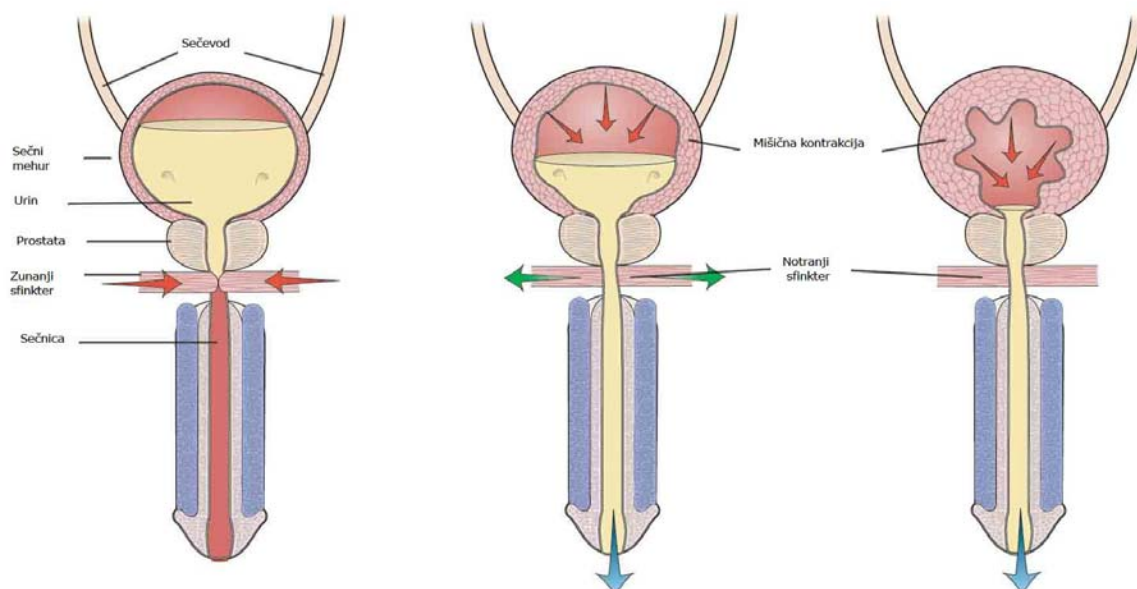
Graf 1: Rezultati meritev ELISA testa (črne točke) glede na referentno vrednost 7,5 kU/L ter rezultati BladderCheka (rdeče točke).....	29
Graf 2: Prikazuje porazdelitev lažno pozitivnih ter lažno negativnih rezultatov, glede na opravljen ELISA test	34
Graf 3: Prikazuje porazdelitve lažno pozitivnih ter lažno negativnih rezultatov pri preiskavi BladerCheku	35
Graf 4: Prikazuje primerjavo specifičnosti ter občutljivosti obeh uporabljenih se metod ..	38

1 UVOD

1.1 Rak sečnega mehurja

1.1.1 Zgradba (anatomija) sečnega mehurja

Sečni mehur ali sečnik je rezervoar za urin (5). Sečila pa so najpomembnejši organ za izločanje. Sečila vzdržujejo stalno sestavo telesnih tekočin, ker iz telesa odstranjujejo ali zadržujejo vodo, elektrolite in presnovne produkte. Glavni del sečil sta ledvici, ki tvorita urin. Sečni mehur (vesica urinaria) je votli mišični organ katerega naloga je shranjevanje urina. Leži za sramnico. Ko je prazen ga ni mogoče tipati, poln pa sega nad sramnico, in v primeru, da se voda zapre, lahko ta sega do popka. V tem primeru ga je mogoče tipati kot elastično žogico, ker je spredaj samo trebušna stena. Pri ženskah leži za mehurjem maternica in sprednja stena nožnice, pri moških je pod njim prostata, za njim pa danka (1). Volumen sečnega mehurja pri odraslem znaša 400-500 ml. Na zadnji strani vstopa v mehur sečevoda. Prostata, ki se nahaja tik pod mehurjem, pa obkroža začetni del sečnice. Sečni mehur je zelo dobro prekrvavljen. Mezgovnica (limfa) se vteka v področne ali regionalne bezgavke. Po tej poti se omogoči širjenje rakastih celic v bezgavke (3). Steno sečnega mehurja gradijo tri plasti; znotraj je sluznica, srednja plast pa je mišičje, ki ga od zunaj prekriva vezivo. Prazen mehur ima debelo steno in nagubano sluznico, poln pa raztegnjeno in tanko steno ter gladko notranjo površino (slika 1). (1,3,5)



Slika 1: Prikaz mehurja v praznem in polnem stanju

1.1.2 Bolezni urinarnega trakta

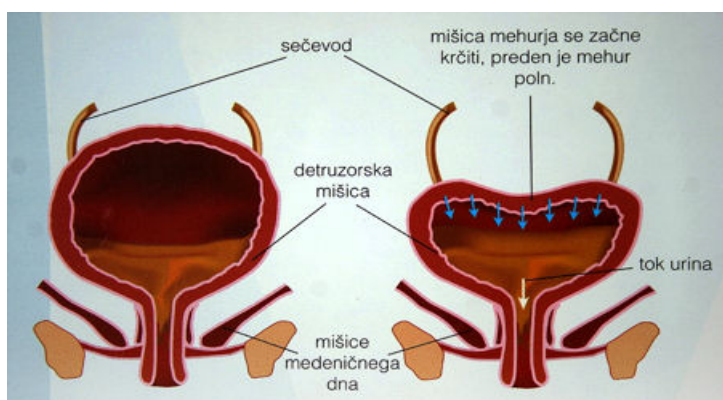
Pogostost okužbe sečil se razlikuje tako pri moških kot pri ženskah, predvsem zaradi razlik v starosti. Poleg okužb dihal so okužbe sečil najpogostejše pri ljudeh vseh generacij. V odrasli dobi najpogosteje zbole vajo ženske. Po 55. letu starosti pa zaradi povečane prostate zbole vajo moški. Pri obeh spolih, s starostjo pogostost okužb sečil narašča. Pri nekaterih skupinah ljudi je tveganje za okužbo večje; med te prištevamo predvsem bolnike z anatomskimi ali funkcijskimi motnjami pri delovanju sečil, nosečnice, pa tudi bolnike po presaditvi ledvice in spolno aktivne homoseksualne moške. Prve akutne okužbe, ki se pojavijo v odrasli dobi, praviloma ne povzročajo kronične ledvične okvare ali arterijske hipertenzije.(2)

Bolezni urinarnega trakta so različne:

- PREKOMERNO AKTIVNI SEČNI MEHUR (PASM),
- SEČNI KAMNI,
- RAK PROSTATE,
- BENIGNO POVEČANA PROSTATA (BHP),
- MOŠKA NEPLODNOST (INFERTILNOST),
- UHAJANJE SEČA PRI ŽENSKAH (INKONTINENCA),
- MOTNJE EREKCIJE,
- RAK SEČNEGA MEHURJA.(2)

1.1.2.1 PASM

PASM je opisan kot simptom, pri katerem so pogosti nezadržni pozivi na mokrenje, lahko povezani tudi z uhajanjem vode. Pogosto je povezano tudi z večkratnim nočnim vstajanjem zaradi siljenja na vodo. Ob tem pa običajno ne najdemo nobenih metabolnih ali patoloških sprememb, ki bi lahko bile vzrok takšnega stanja. Pri normalnem delovanju sečnega mehurja se ta počasi polni s sečem, ki priteka po sečevodih iz obeh ledvic. Pri tem se mišica stene ali detruzor razteza, kar imenujemo razteznost. Pri določeni napolnjenosti mehurja, se sproži refleksni mehanizem, ki povzroči krčenje mišice mehurja, pri tem ta iztisne seč iz mehurja v sečnico. Pri PASM je razteznost mehurja zmanjšana in krčenje se sproži pri minimalni napolnjenosti mehurja. Posledično ima bolnik občutek pogostega, stalnega tiščanja na vodo (slika 2).



Slika 2: Prikaz mehurja s razvitim PASM simptomom

PASM prizadane tako moške kot ženske. Med spoloma ni razlik, kar 17% žensk in 16% moških ima takšne težave. 4x pogosteje pa uhajanje vode spremlja ženske kot moške. S starostjo pa se pogostost teh simptomov stopnjuje. Ni jasno ali so starostne spremembe na organih, kot so povešanje mehurja pri ženskah in benigno povečana prostata pri moških, vzrok za pogostejše uhajanje vode. Vsekakor pa uhajanje vode pri PASM ne smemo mešati z uhajanjem vode pri stresni inkontinenci, kjer je vzrok v oslavitvi podpornih mišic, ki obdajajo sečnico. Ta oslabeitev je pri ženskah najpogosteje starostna, pri moških pa pogosto povezana ravno zaradi poškodbe po operativnem posegu prostate. Simptomi te bolezni močno vplivajo na socialne kontakte, kot tudi na delovne sposobnosti, ki jih v tem primeru zmanjšajo.

Ker se bolnikom zmanjša delovna sposobnost, posledično morajo pogosto menjati delovno mesto. Vsekakor pa je pomembno, da zdravnik postavi pravo diagnozo. V pomoč nam je vprašalnik PASM, ki ga mora izpolni bolnik sam. V kolikor oseba zbere 8 točk ali več, je velika verjetnost da ima PASM. Posebej pozorni pa moramo biti pri moških težavah, ki jih povzroči povečana prostata, saj te lahko oponašajo težave pri PASM-u. Zdravljenje je večstopenjsko, vendar ozdravljivo, a se oseba kljub temu mora naučiti normalnega odvajanja, vključno s tem, da spremeni način prehranjevanja, s tem mislimo omejiti pitje alkohola, prave kave, umetnih sladil in sladkorja.(2)

1.1.2.2 Sečni kamni

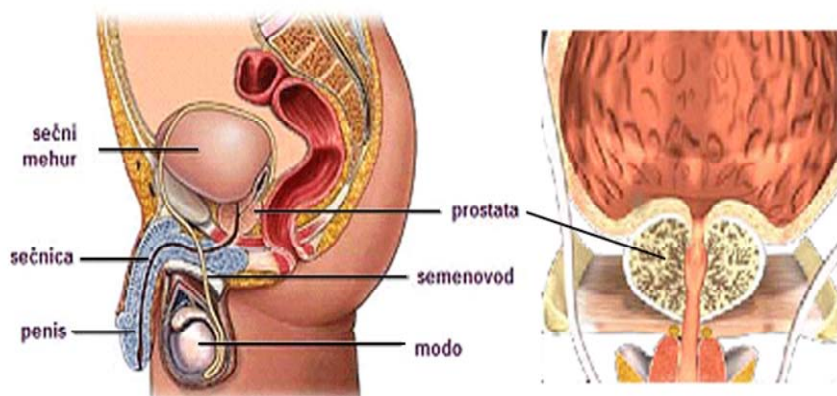
Kamni v sečilih ali urolitijaza je bolezen, ki spremlja človeka že tisočletja. Pri Evropejcih in Azijcih je bolezen pogostejša, redkejša pri židih, črncih in indijancih. Kamni se najpogosteje pojavljajo med 18. in 45. letom starosti, lahko pa jih imajo tudi otroci ali ljudje v pozni starosti. Lahko pa sečne kamne najdemo kjerkoli v sečnem traktu od ledvic do sečnice. Vzroki nastanka kamnov so lahko bodisi notranji (telesni) ali zunanji (vpliv okolja). Med notranje vzroke štejemo bolezni ki so dedovane, tudi motnje v presnovi ter anatomske spremembe v sečilih. Ledvična tubularna acidoza je najpogosteje podedovana bolezen, ki povzroči nastanek številnih kamnov v obeh ledvicah. Druga taka je cistinurija. Glavna zunanja vzroka za nastanek kamnov v sečilih sta klima (temperatura in vlaga) ter prehrabene navade, oboje pa zavisi od zemljepisnega področja. Visoke temperature z obilnim znojenjem in premajhnim uživanjem tekočine vodijo pogosto do nastanka koncentriranega seča, kar lahko posledično povzroči nastanek kamnov (slika 3) . V sečilih lahko nastanejo kamni različnih kemičnih sestav, med najpogostejšimi pa so kalcijevi kamni. Ti so pogosto v obliki kalcijevega oksalata 65-70 % ali kalcijevega fosfata v 9-10 %. Manj pogosti so kamni iz sečne kisline (urati), cistinski kamni (cistin) in ksantinski. Ker so kamni zelo majhni, jih opisujemo kot pesek, lahko pa so tako veliki, da lahko zapolnijo celotni zbiralni sistem ledvice. Običajno so posamezni ali v gručah, prisotni v eni ali v obeh ledvicah. Pri bolnikih s povečano prostato, ki imajo motnje v odtoku seča iz mehurja , se lahko kamni tvorijo v mehurju in povzročijo stalno tiščanje na vodo ter pogosta vnetja. Kamen , ki dolgo časa draži sluznico sečnega mehurja, je lahko pogost vzrok nastanka raka sečnega mehurja.



Slika 3: Primer sečnega kamna

1.1.2.3 Rak prostate

Prostata je žleza, ki se nahaja v moškem telesu in je sestavni del moških spolnih organov. Velika je približno kot oreh, približno štiri centimetre. Leži pred danko in pod mehurjem. Prostata obdaja sečnico, ki služi za odvajanje urina iz mehurja navzven (slika 4). Poglavitna funkcija je proizvodnja semenske tekočine, ki ščiti in služi kot sredstvo za prenos semenčec.



Slika 4: Prostata

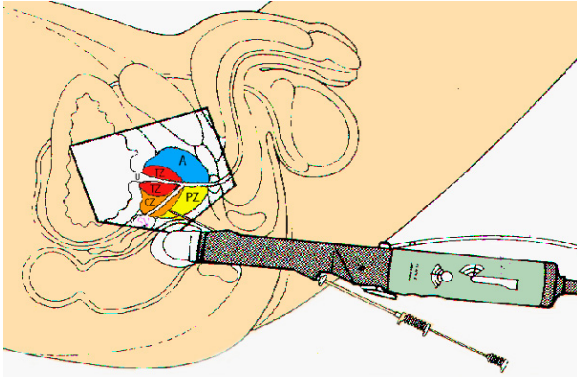
Rak prostate je znana bolezen prostate, ki prizadane predvsem starejšo populacijo ljudi, in s starostjo narašča. Gre za primarni rak, kar pomeni, da se rak prične v prostati in se ni na prostato razširil iz drugega dela telesa. Vendar se rak prostate lahko razširi v druge dele telesa. Pri starejših moških je to eden najpogostejših rakastih obolenj po 50.letu, redkej pa pred 45. letom starosti. Pri 50 letih ima raka na prostati 9.5%, pri 65 letih pa 13% moških.

V svetu se je pričakovalo leta 2007 do 1,6 milijona bolnikov z rakom prostate, kar pomeni prirast na leto za kar 3,8% . Vzrok nastanka takšnega rakastega obolenja ostaja še vedno neznan.

Glavni dejavniki tveganja so starost, rasa in dednost, vendar pa so raziskave pokazale, da je lahko povezan s koncentracijami moškega spolnega hormona testosterona. Vsekakor pa je najpomembnejši dejavnik tveganja starost moškega, vpliva pa tudi nepravilna, predvsem mastna prehrana, ki prav tako poveča nevarnost nastanka raka. Rak prostate je pri moških odkrit, pogosto s pomočjo testiranja za prostato specifičnega antigena (PSA) ali z digitalnim rektalnim pregledom. Pri pojavu simptomov moramo vedeti, da nobeden izmed njih ni lasten samo raku prostate. Nerakavo povečanje prostate, t.i. benigno povečana prostata (BHP), je znak, ki se pojavi pri moških, ki imajo nerakavo bolezen. Znaki, ki so najpogostejši pri napredovalnem raku prostate so predvsem bolečine v kosteh (zlasti v hrbtenici, zgornjem delu stegen, bokih), lahko pa se kažejo tudi z utrujenostjo, pomankanjem teka, hujšanjem, bolečinah v trebuhu, otekanjem mod in spodnjih okončin, redkeje s kašljem in z dušenjem.

Preiskave s katerimi prepoznamo rak prostate so različne:

- z **biopsijo prostate**, pri kateri uporabljamo vzmetno iglo. Pod UZ kontrolo vzamemo 6-12 vzorcev iz celotne žleze. Pojavijo pa se lahko tudi možni zapleti po opravljeni biopsiji, kot so povišana temperatura, prostatitis, kri v blatu, hematurija.
- **digitorektalni pregled (DRP)** je in ostaja še vedno kot osnovna preiskava, pri kateri urolog s prstom otipa prostato skozi analno odprtino, pomemben del preiskave bolnika. Rak se v periferni coni prostate lahko otiplje, v centralni coni (v 5%) ali v prehodni coni (25%) se pa ne otiplje. Pregled ni boleč. Rakasto spremenjena prostata je trda, neravna in asimetrična. Vendar tudi na otip normalna prostata že lahko vsebuje rakaste celice.
- **Transrektalni UZ (TRUZ)** je diagnostični postopek, kjer urolog ultrazvočno sondo vstavi skozi črevo in prostato pregleda (slika 5). Pregled bolnika traja le nekaj minut, je neboleč, in za pregled ni potrebna posebna priprava. S to metodo ocenimo velikost prostate in spremembe te. Posebej pa nas zanima ali so v tem predelu prisotna rakasta tkiva.



Slika 5: Prikaz transrektalnega ultrazvoka

1.1.2.4 BHP

S staranjem se prostata navadno poveča, kar imenujemo benigno povečana prostata ali BHP. Povečanje prostate sčasoma doseže mejo, pri kateri se zaradi okolnega veziva ne more več povečati njen volumen, zato pritiska na sečnico, stena mehurja se tako zadebeli in postane dražena. Zaradi draženja se krčenje mehurja pojavi pri manjših volumnih urina in odvajanje oz. uriniranje postane pogostejše. Prvi znaki pri mokrenju so šibak curek seča, čakanje na začetek uriniranja, nekontrolirano kapljanje seča po mokrenju in uhajanje seča pri prekomerno napolnjenem mehurju. Posledično na koncu sečni mehur oslabi, ter izgubi sposobnost popolne izpraznitve, zaradi česar urin zastaja v sečnem mehurju. Zoženje sečnice ter zastajanje urina v sečnem mehurju sta glavna vzroka za veliko večino težav pri bolezni BHP.

1.1.2.5 Inkontinenca

Je nezmožnost zadrževanja urina, ktere najpogostejši vzrok je težava z mišicami, ki zadržujejo urin. Prične se z občasnim uhajanjem in vodi vse do popolne nezmožnosti zadrževanja urina. Ta oblika bolezni je pogostejša pri starejših osebah, prizadane predvsem ženske. Inkontinenco, ki običajno ni urgentno stanje, mora obravnavati zdravnik specialist urolog ali ginekolog, ki priporoči ustrezno zdravljenje. Pri otrocih je ta oblika redka, lahko pa urin uide občasno do šestega leta starosti, vendar to pripišemo predvsem psihičnim motnjam.

Vrste inkontinence lahko razdelimo na:

- akutno, ki je posledica sprememb v sposobnosti uriniranja,
- trajno, ki je posledica kroničnih stanj.

Glede na vzroke:

- stresna pojavi se uhajanje urina predvsem pri kašljanju, kihanju ali drugih gibih, ki posledično povečajo pritisk v sečnem mehurju. Mišice medeničnega dna dajejo oporo sečnemu mehurju, če postanejo te mišice šibke, se mehur pomakne navzdol proti nožnici. Posledica premika je, v oslABLJENI učinkovitosti zapiralk na vratu mehurja in tako urin priteče iz mehurja v sečnico med gibi, ki povečajo pritisk v mehurju;
- urgentna je posledica nepravilnega krčenja mehurja;
- funkcionalna se pojavlja, če je oviran predvsem pravočasen prihod na stranišče, zaradi preprek v mišljenju, gibanju ali komunikaciji.

1.1.3 Pogostost raka sečnega mehurja

Rak sečnega mehurja, žal sodi med rakasta maligna obolenja, ki so v porastu. Je heterogena bolezen. Med tumorji na sečilih je rak sečnega mehurja na drugem mestu, takoj za rakom na prostati. Čeprav vedno več ljudi zboleva, je vendarle vzpodbuden napredek pri zdravljenju, ki omogoča obolelim vse večjo kakovost življenja. Sodi med deset najpogostejših rakov pri moških. Predstavniki moškega spola obolevajo kar 3x pogosteje kot ženske. Lahko zapišemo tudi v obliki razmerja (moški-ženske) 3:1. Tako po podatkih Registra raka za Slovenijo leta 2002 zbolelo za rakom sečnega mehurja 138 moških in 50 žensk. Največja obolevnost je med 60 in 70 letom starosti. Obolevanje pri moških strmo in zanesljivo narašča ter vse pogosteje oboleva tudi mlajša populacija ljudi. Incidenca raka po svetu in v Sloveniji narašča. V Sloveniji je bila incidenca raka mehurja v letih 1988-1992 12/100.000. (4,5)

1.1.4 Etiologija

Sama etiologija raka sečnega mehurja ni dokončno pojasnjena. Vplivajo tako genetski kot tudi dejavniki okolja. Ta oblika rakastega obolenja (slika 6) je prva oblika raka notranjih organov, za katerega so ugotovili povezanost s kemičnimi karcinogeni na delovnem mestu. Danes veljajo nekatere barve v tekstilni industriji, tako tudi barve za pleskanje in lase kot dokazani karcinogeni dejavniki nastanka raka sečnega mehurja.

Zato je ta oblika raka pogostejša pri izdelovalcih gum za avtomobilске pnevmatike in električne kable. Tudi ionizirajoče sevanje, kot obsevanje medenice večja tveganje zbolevanja za rakom sečnega mehurja. Med izpostavljene skupine sodijo tudi rudarji, govorimo predvsem o vplivu karcinogenov v premogovnem prahu in tudi tisti, ki so izpostavljeni pesticidom in naftnim derivatom.

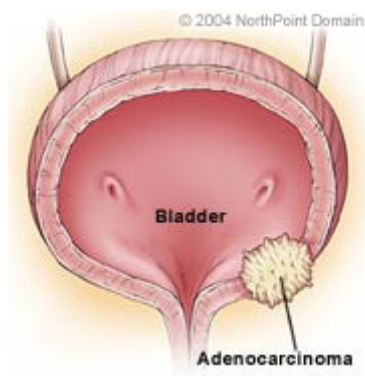
Na nastanek vplivajo:

Kemični dejavniki med te sodijo:

- *kajenje* (pri kadilcih se pojavi rak sečnega mehurja dvakrat pogosteje, kot pri nekadilcih);
- *kemični karcinogeni v industriji* (aromatični amini, med aromatičnimi amini ne moremo določiti enega samega vzročnega karcinogena, ker so delavci večinoma bili izpostavljeni več aromatskim aminom naenkrat. Med najpogostejšemi srečamo benzidin, 2-naftilamin, avramin. Ogroženi so predvsem delavci v kemični, lesni, usnjarski in gumarski industriji.); (5)
- *nekatera zdravila* (predvsem govorimo o zlorabi le teh, za lajšanje bolečin, to so predvsem fenacetinski analgetiki).

Fizikalni dejavniki: predstavniki teh so obsevanje z ultravijoličnimi žarki, radioaktivni elementi, kot tudi ionizirajoče sevanje.

Biološki dejavniki: govorimo predvsem o povezavi nastanka rakastega obolenja zaradi okužbe, ki je povezana z večjim tveganjem pojava ploščatoceličnega raka sečnega mehurja.(4,5,6)



Slika 6: Rak sečnega mehurja (bladder - sečni mehur)

1.1.5 Nastanek in razvoj rakave bolezni

Tumorje delimo na maligne ali benigne oblike, ki nastanejo zaradi nebrzdanega razmnoževanja in rasti telesu lastnih izrojenih celic na kateremkoli mestu človeškega telesa.

Za rakom lahko zboli človek vseh starostnih obdobjih, vendar je bolezen po 40. letu pogostejša. Kar je najhuje, je to, da rak na začetku večinoma z ničemer ne opozarja nase in tudi ne boli. Zaradi tega večkrat tudi spregledamo začetna znamenja, ki pa so zelo važna za zgodnjo spoznavo in tudi seveda uspešno zdravljenje. Celice, ki so bile normalni državljani v službi našega organizma, so spremenile svoje obnašanje in napravile prestopke, prekršek. V tem primeru ne izpolnjujejo zahtev organizma. Začne se nenadzorovano razmnoževati kot tudi deliti, s tem pa začne osvajati zdrava tkiva in širijo svoj negativni vpliv. To rast, ki je anarhistična, imenujemo rakavo rast. Torej celice rastejo izven nadzora celotnega organizma. Razlika med rakasto in zdravo celico je ta, da se rakasta otrese kontroli organizma, začne izgubljati svojo posebnost ter značilnost, ki jo je imela, ko je bila še normalna. Po obliki postaja vedno bolj primitivna ter neenaka celici, iz katere se je ta razvila. Pravega vzroka za nastanek in razvoj bolezni še ni znan. Rakavo rast označujejo tri dogajanja: divja rast celic v organizmu, razlike med rakavimi in zdravimi celicami in potovanje rakavih celic s prvotnega mesta rasti v druge dele telesa (metastaziranje rakave celice z mezgo, krvjo ali z lastno slino) (7)

1.1.6 Znaki bolezni

Zgodnji znaki so običajno zelo skromni včasih celo podobni lažnemu vnetju mehurja. Prvi in najpogostejši znaki bolezni so bolečine po odvajanju urina, kri v urinu, ter potreba po pogostem in nujnem odvajanju (8). Znak raka sečnega mehurja je pojav krvi v urinu pri 75-90% obolelih, vendar tega pojava ne spremlja nikoli bolečina(4). Kri se lahko pojavlja med uriniranjem ali pa ob koncu, ko se sečni mehur stisne. Krvavitve pri bolnikih so lahko zelo masivne kar pomeni, da oseba urinira čisto kri ali pa je le ta mikroskopska, kar pomeni, da jo lahko vidimo le pod mikroskopom. Stopnja hematurije ni odvisna od stadija bolezni, vendar je krvavitev velikokrat občasna. Pri 30% bolnikov se kažejo motnje pri odvajanju vode po vse večji pogostosti in nujnosti. Odvajanje pa zna biti zelo pekoče in neprijetno. Znaki lokalno razširjene oz. napredovane bolezni so bolečine v mali medenici, otekle noge, zapora danke.(4)

Če tumor v sečnem mehurju zapre izvodilo sečevoda, bolnik začuti bolečine v isto stranski ledvici, ker se urin mora izprazniti iz nje v mehur. Sčasoma postaja urin vedno bolj krvav in ta oblika krvavitve bolnika izčrpava in povzroča večjo slabokrvnost. Bolečine so vse močnejše, ker se ob boleznih zaradi zastoja urina pojavi še velikokrat okužba urina. Rak sečnega mehurja je posledica kroničnih stanj t.i. trajne inkontinence. (7)

1.1.7 Diagnoza raka sečnega mehurja

Za potrditev zgodnje diagnoze, ki je ključnega pomena, je potreben odvzem tkiva in pregled tega pod mikroskopom. Hematurija, kot sem že prej omenila, je najpogostejši znak oz. simptom pri raku sečnega mehurja. Za ugotovitev oz. potrditev diagnoze, pa lahko opravimo različne preiskave:

Fizikalni pregled: V 85% je rak mehurja običajno površinski, ter klinični status takšnega bolnika je običajno normalen in ne moremo najti kaj dosti. Potrebno je v tem primeru opraviti digitorektalni pregled, kjer pri napredovanem raku mehurja lahko zatipljemo zatrdlino in ocenjujemo premakljivost tumorja. Pri bolj napredovani obliki te bolezni lahko najdemo zvečane bezgavke v dimljah, trebuhu ali vratu.

K fizikalnim pregledom prištevamo še laboratorijske preiskave urina in krvi:

- pregled in analiza urina zaradi prisotnosti krvi (hematurija);
- celotni hemogram za oceno slabokrvnosti oz. anemije;
- kontrola profila za podajo ocene nenormalnosti kosti, ledvic in jeter;
- energično spiranje mehurja za preiskavo celic in pretočno citometrijo.

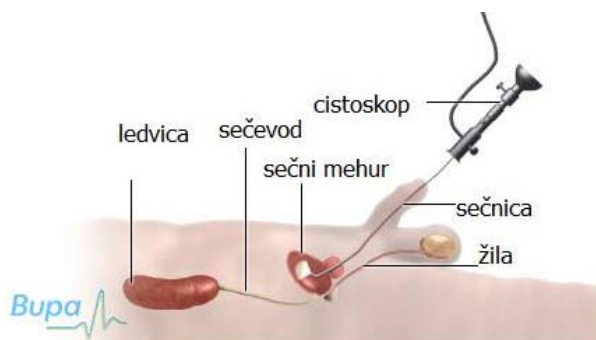
Citološka preiskava seča se opravi predvsem zaradi preprostega načina odvzema in velike diagnostične zanesljivosti. Ta metoda je predvsem primerna za odkrivanje raka sečnega mehurja pri ogroženih bolnikih brez simptomov, s simptomi, za odkrivanje ponovitev ter za spremljanje zdravljenja rakastega obolenja na sečnem mehurju. Citološki pregled seča, žal ni vedno uspešen.

Slikovne preiskave:

Cistoskopija je najpomembnejša preiskava, ki diagnozo zanesljivo potrdi. Pri tej preiskavi zdravnik mehur pregleda s tankim, svetlobo oddajajočim inštrumentom, ki se imenuje cistoskop. Cistoskopija je izredno boleča, ter neprijetna preiskava, ki jo lahko izvedemo tudi pod vplivom anestezije(8).

Je majhna upogljiva cevčica, ki jo potisnemo skozi sečnico v mehur, kar prikazuje tudi slika 7 in s pomočjo te lahko vidimo kako izgleda sluznica mehurja, vstopna mesta sečevodov in vidimo ali gre morebiti za krvavitev iz sečevodov.

Ta inštrument (slika 8) nam omogoči, da lahko vidimo mesto, obliko ter velikost tumorja.



Slika 7: Cistoskopski pregled



Slika 8: Cistoskop

Transuretrna resekcija (TRU) mehurja: Običajno se ta poseg opravi v bolnišnici, kjer med anestezijo odščipnejo košček sluznice mehurja, ki ga nato pregleda patolog. Če je tumor večji, po posegu bolnik ostane v bolnišnici čez noč, da je pod nadzorom zdravstvenega osebja. Da lahko zdravnik pregleda sečni mehur potrebuje cistoskop. Če je rakasto obolenje v zgodnji fazi in raste počasi, je ta lahko odstranjen z cistoskopom. Postopek odstranitve tumorja med cistoskopijo pa imenujemo TUR oz. transuretrna resekcija. (6)

Ultrazvok je hitra enostavna in pogosto prva oblika slikovne preiskave pri diagnostiki sečil zaradi neinvazivnosti in razmeroma velike zanesljivosti. Ker sečni mehur leži za sramno kostjo in globoko v medenici ga je težko oceniti z drugimi diagnostičnimi metodami. Z UZ ga je mogoče pregledati zelo natančno, prikaže tudi stanje ledvic vendar manjših sprememb ne moremo opaziti. Pri tej preiskavi mora biti mehur poln. (6)

CT preiskava (računalniška tomografija) in magnetna resonanca (MR) nam omogočita natančnejši prikaz. RTG slika urotrakta z enako zanesljivostjo opredeli vzroke hematurije kot intravenska urografija. Zanesljiva je še bolj pri diagnostiki raka mehurja, koristna pa pri odkrivanju in opredelitvi stadija rakastega obolenja. (6)

Intravenska urografija: je najpogostejša fiziološka preiskava kontrastnega sredstva, ki se izvaja po stopnjah. Je sorazmerno enostavna, ne povzroča težav, je funkcionalna preiskava uropoetskega trakta. Mehur se pokaže le, če je ta poln. Pomen te preiskave je ta, da:

- pokaže potek ureterjev,
- velikost, obliko ter defekte v mehurju,
- v grobem prikaže funkcijo ledvic,
- po izpraznitvi mehurja nam rezidualni urin pokaže obseg zastoja, defekte v mehurju in prostato,
- prikaže polnitveno motnjo, tumor v predelu zgornjih sečil (6%). Ko rak mehurja zajame uretrna ustja ali pri raku sečevodov, vidimo hidronefrozo (hidronefroza ali obstrukcija povzroči zastoj seča v sečevodu).

Scintigrafija skeleta: je vprašljiva glede kliničnega pomena, razen v primeru zvečane vrednosti alkalne fosfataze in bolečin v kosteh.

1.1.8 Zdravljenje

Zdravljenje bolnikov se prične nekaj tednov po postavitvi diagnoze. Zdravnik pripravi za vsakega pacienta poseben načrt, kako se zdraviti, a izbira terapije je odvisna od stopnje in stadija karcinoma. Stopnja rakastega obolenja se kaže v tem, koliko se tumorske celice razlikujejo od normalnih in kako hitro bo karcinom rasel. Za zdravljenje rakastega obolenja sečnega mehurja, uporabljamo različne vrste zdravljenja:

- operativno
- obsevalno
- kemoterapijo (4)

1.1.8.1 Operativni poseg

Operativni posegi so pogosta metoda izbire zdravnika. Poznamo različne vrste kirurških posegov:

- transuretralna resekcija:
- radikalna cistektomija: najpogostejša metoda za invazivne karcinome. Pri mišično invazivnem raku sečnega mehurja je operacija nekoliko obsežnejša, potrebno je odstraniti sečni mehur v celoti, pri moškem tudi prostato, pri ženski pa rodila. Pri izvajanju operativnega posega kirurg vedno odstrani tudi bezgavke, ki se nahajajo ob mehurju;
- delna cistektomija: odstrani se del sečnega mehurja. Običajno se ta postopek koristi pri karcinomu nizke stopnje.

1.1.8.2 Obsevanje

Radioterapija je vrsta lokalne terapije, kjer so obsevane samo celice v tem področju. Z obsevanjem, ki je način zdravljenja rakavih bolezni, uničimo oz. ubijemo tumorske celice s pomočjo visokoenergetskih delcev. Zdravljenje z obsevanjem skrbno vodi ter načrtuje zdravnik radioterapevt. Ta način omogoča učinkovito zdravljenje raka sečnika, vendar je učinkovitost odvisna od velikosti tumorja ob pričetku obsevanja. Čim manjši je tumor bolj učinkovito je obsevanje. Pred kirurškim posegom gre zelo majhno število bolnikov najprej na obsevanje, vsekakor s ciljem, da bi se tumor zmanjšal. Nekateri bolniki, pa gredo na obsevanje po kirurškem posegu, da bi se uničile še preostale rakaste celice. Poznamo dva pomembna načina obsevanja karcinoma sečnega mehurja:

- zunanje sevanje: iz velikega aparata v katerem se nahaja telo, sevajo žarki v področje tumorja. Običajno ta oblika terapije traja 5x tedensko 5 do 7 tednov, krajša pa je, ko se uporabita kombinaciji obeh sevanj;
- notranje sevanje: tukaj govorimo o vnosu radioaktivne snovi v sečni mehur, skozi rez na abdomenu ali preko sečne cevi. (5)

1.1.8.3 Kemoterapija

Je metoda zdravljenja, pri kateri se uporabljajo tudi zdravila (eno ali kombinacija večih zdravil) za uničenje rakastih celic. Ločimo lokalno in sistemske terapije. Za lokalno terapijo je značilno to, da zdravnik vnese zdravilo s katetrom v mehur. Zdravilo v tem primeru ostane v sečnem mehurju nekaj ur in večinoma deluje le na celice v mehurju. Pri sistemski terapiji ali intravenski kemoterapiji se zdravilo injicira v veno, torej teče po krvnem obtoku, skoraj do vseh delov telesa. S sistemsko kemoterapijo zdravimo invazivne rake sečnega mehurja, z namenom ozdravitve raka, za upočasnitev tumorske rasti in za ublažitev simptomov, ki jih to rakasto obolenje povzroča. (4,5)

1.2 Klasifikacija

1.2.1 Klasifikacija tumorjev sečnega mehurja po WHO

Tumorje sečnega mehurja po WHO delimo v 5 velikih skupin, od katerih je najpogostejša oblika epiteljskega tumorja. V 90% so to tumorji prehodnega epitelija, ostali pa so drobnocelični karcinom, ploščatocelični in tumorji neepiteljskega izvora.

EPITELJSKI TUMORJI:

- epitelij prehodnega epitelja
- ploščatocelični karcinom
- adenokarcinom
- nediferencirani karcinom
- drobnocelični karcinom
- sarkomatoidni karcinom

MEZENHIMSKI TUMORJI:

- benigni: lipom, leiomiom
- maligni

TUMORJI RAZLIČNEGA IZVORA:

- maligni melanom
- maligni limfom

SEKUNDARNI TUMORJI

NEKLASIFICIRANI TUMORJI (6)

1.2.2 Klasifikacija TNM raka mehurja

T - pomeni velikost tumorja

N - razširjenost tumorja v bezgavke

M - pojav zasevkov- metastaz v oddaljenih delih telesa

Ta oblika klasifikacije pove, kakšna je velikost tumorja, stopnjo rasti in kam se je ta oblika tumorja razširila. Sama okrajšava TNM, ki jo uporabljamo v medicini pa pomeni: tumor, noduli-limfni vozlički, metastaze.

TNM klasifikacija (za vsako vrsto in podvrsto tumorja)

T0 pomeni, da tumorja ni

T1 pomeni prisotnost manjšega tumorja

T2, T3, T4 večji tumorji, ki se vraščajo v okolico

N0 pomeni da tumor ni prišel v okolico bližnje bezgavke

N1 tumor je prisoten v bližnjih bezgavkah

N2, N3, N4 prodiranje v oddaljene bezgavke s tem tudi nadaljne naraščanje stopnje

M0 oddaljenih metastaz ni

M1 prisotnost oddaljenih metastaz (6)

1.3 Tumorski označevalci

Rezultat maligne transformacije je maligna celica, iz katerih nastane ob vsaki nadaljni delitvi nova maligna celica. V tem procesu pridobijo maligno spremenjene celice nekaj novih lastnosti, po katerih se razlikujejo od nemalignih celic istega izvora. Nastale spremembe se odražajo v spremenjeni morfologiji, fiziologiji in rasti (obnašanju) celice. Te razlike med normalnimi in maligno spremenjenimi celicami uporabljamo za dokazovanje malignega procesa oz. malignih celic. Snovi, ki jih pri tem spremljamo, imenujemo tumorski označevalci (10). Glede na to, da se tumorske celice od normalnih razlikujejo na različnih nivojih, se tudi tumorski označevalci razlikujejo med seboj, ter predstavljajo razmeroma širok pojem. Poleg tega, da zajema veliko različnih snovi, zajema tudi različne procese v celicah. Tako nam kot tumorski označevalci lahko npr. služijo hormoni, encimi, poliamini, nukleozidi, membranski antigeni, produkti onkogenov in drugi.

Tumorske označevalce določamo v telesnih tekočinah, bodisi v obliki novosintetiziranih snovi, kakršnih v zdravem organizmu ne najdemo, bodisi snovi, ki so v normalnem organizmu prisotne v veliko nižjih koncentracijah. Z določanjem tumorskih označevalcev si pomagamo pri diagnozi bolezni, napredovanju njenega poteka, pri določanju stadija bolezni, ter pri bistvenem delu, izbiri načinu zdravljenja ter pri zgodnjem odkrivanju ponovitve in razširitve bolezni. Lahko rečemo, da so dober napovedni dejavnik.(9,10)

1.3.1 Določanje tumorskih označevalcev

Tumorski označevalci imajo v telesnih tekočinah običajno nizke koncentracije, zato za njihovo dokazovanje potrebujemo visoko občutljivo tehnologijo. Tehnike, danes uporabljene, temeljijo na podobnem principu-določanju kompleksov antigena in protiteles. Glede na izvedbo se razlikujejo po spojini, ki je vezana na detekcijska protitelesa in po načinu zaznave nastalih kompleksov:

- Radioimunska metoda (RIA-Radio-Immuno-Assay) – kvantifikacija v sendvič vezanega antigena poteka z radioaktivnimi izotopi;
- Encimskoimunska metoda (ELISA-Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay) kvantifikacija antigena z encimi, ki so vezani na protitelo;
- Luminimetrično-imunska metoda.(9)

Vse naštet metode so prilagojene dokazovanju izredno nizkih koncentracij antigena. V senzitivnosti tako velikih razlik ni, specifičnost metod pa je v veliki meri odvisna od kvalitete protiteles ter od specifičnosti protitelesa za posamezen antigen oz. tumor. Vrednosti tumorskih označevalcev so odvisne tudi od uporabljene metode, s katero jih določamo.(10)

Ena izmed uporabljenih metod določanja tumorskega označevalca je tudi NMP22 BladderChek, hitri test, ki temelji na principu encimsko imunske metode ELISA. Govorimo o kvantifikaciji antigena z encimi, ki so vezani na protitelo.

1.3.2 Lastnosti idealnega tumorskega označevalca

Lastnosti idealnega tumorskega označevalca so:

- vsak označevalec naj bi bil značilen za določen organ in tumor
- dokazan mora biti pri vseh bolnikih z istovrstnim malignim tumorjem
- tvoril bi se v zadostnih količinah, da ga lahko zaznamo na začetni stopnji razvoja malignega tumorja
- označevalce naj tvori samo maligno tumorsko tkivo
- serumske koncentracije označevalca naj bi se nanašale na velikost tumorske mase

Poznamo pa tudi nekaj znanih pomanjkljivosti tumorskih označevalcev, in te so:

- tvorba v povsem zdravih tkivih;
- tvorijo se pri različnih fizioloških stanjih; menstruaciji, nosečnosti, laktaciji
- nezadostna specifičnost za vrsto rakave bolezni;
- tvorba označevalcev v visokih koncentracijah pri nemalighnih procesih; različna vnetja, benigni tumorji, bolezni jeter in trebušne slinavke.(9,10).

1.3.3 Biološki faktorji, ki lahko vplivajo na serumske koncentracije tumorskih označevalcev

Vemo da idealnega tumorskega označevalca ni, vpliva pa na serumske koncentracije tumorskih označevalce veliko dejavnikov.

Lažno pozitivni rezultati:

- vnetni procesi;
- benigne bolezni jeter ter posledične motnje metabolizma in izločanja (AFP, TPA, CA 19-9, CA 15-3, CEA);
- obsežna tumorska nekroza;
- motnje v delovanju ledvic;
- posledice diagnostičnih in terapevtskih postopkov (rektalni pregled, mamografija, radio- in kemoterapija);
- fiziološka stanja (nosečnost, menstrualni cikelus). (9,10)

Lažno negativni rezultati:

- popoln izostanek sinteze (npr. CA 19-9);
- slabo izražene antigenske determinante;
- slaba prekrvavitev tumorja;
- nastajanje tumorskih kompleksov z organizmu lastnimi protitelesi;
- hiter razpad in izločanje antigenov. (9,10)

1.3.4 Kdaj določiti tumorski označevalec

Tumorske označevalce določamo pred operativnim posegom in pred kakršnim koli drugim zdravljenjem bodisi hormonskim, radioterapijo, kemoterapijo. Zelo pomembno je da jih določimo tudi po operativnem posegu, tako med zdravljenjem in po končanem zdravljenju, enkrat na 3 do 6 mesecev do drugega leta, kasneje pa le enkrat letno oz. ob rednih pregledih. Določamo jih tudi pri napredovanju bolezni ali sumu ponovitve te, kot tudi pred spremembo terapije. Tumorske označevalce določamo najmanj 3 tedne po začetku nove terapije. (9)

1.3.5 Delitev tumorskih označevalcev

Delitev tumorskih označevalcev poteka na več načinov: po kemični strukturi, po vrstah tumorske bolezni, po mestu nastanka in podobno. Najpogosteje uporabljena razdelitev združi njihove biokemične lastnosti, njihovo mesto nastanka ter funkcionalnost.

Po razdelitvi pa jih delimo na- onkofetalne proteine, hormone, encime, tumor spremljajoče antigene in skupino mešanih označevalcev.

Onkofetalni proteini

So antigeni, ki nastajajo med embrionalnim razvojem. Tvorba teh pri odraslih je omejena ali ustaljena. Ponovna aktivacija nekaterih genov, ki kontrolirajo rast celic so neposredno povezani z malignim procesom in to je posledica povišane koncentracije le teh. Značilna in pomembna predstavnika te skupine sta CEA karcinoembrionalni antigen in AFP alfa-fetoprotein. CEA eden od najdlje znanih, med embrionalnim razvojem nastaja v epiteljskih celicah gastro-intestinalnega trakta, jeter in trebušne slinavke. Najprej so mislili da gre za idealnega označevalca, vendar so hitro odkrili da je ta prisoten tudi v nekaterih normalnih tkivih odraslih, npr. v črevesni sluznici in plevri.

Hormoni

Spremembe v sintezi in izločanju hormonov so vsekakor posledica maligne tvorbe. Te sprožijo tako kvantitativne kot tudi kvalitativne spremembe. Kvantitativne spremembe so kazalci razvoja tumorja v tkivu endokrinih žlez in se posledično zaradi maligne transformacije celice produkcija hormona poviša ali zniža. Insulin, prolaktin, parathormon in drugi so v skupini hormonov endokrinih tumorjev.

Kvalitativne spremembe so posledica maligno transformirane celice nekaterih organov (pljuča, jajčniki, želodec). Od vseh hormonov je β hCG (beta horionski gonadotropin) najbolj uveljavljen kot tumorski označevalec. Je protein, ki ga uvrščamo v posebno skupino karcinoplacentarnih antigenov-proteinov, ki nastajajo med nosečnostjo v placenti. Spomočjo določitve tega hormona temelji večina preskusov za odkrivanje zgodnje nosečnosti. Pri odraslih so lahko prisotni le izjemoma, rahlo povečane vrednosti β hCG lahko zasledimo tudi pri bolnikih z rakom dojke, pljuč, želodca, jeter in debelega črevesja, vendar v klinični praksi za spremljanje teh bolnikov niso pomembni.

Encimi

Pomemben encim v normalnem tkivu je prostatična kislina fosfataza. Določanje te je primerno za razlikovanje benignih procesov (hipertrofija) od malignih. Alkalna fosfataza (AF) obstaja kot vrsta izoencimov, ti nastajajo bodisi v jetrih, kosteh ali v placenti. Nevronska specifična enolaza (NSE) je citoplazemski glikolitični encim. Uporabljamo ga za spremljanje zdravljenja in poteka bolezni pri bolnikih s tumorji z nevroendokrino diferenciacijo. Ker je zanj značilna slaba občutljivost in specifičnost ni primeren za presejanje kot tudi za pomoč pri postavitvi diagnoze. Med nespecifične encimske označevalce uvrščamo LDH-laktatdehidrogenazo, ki se pogosto pojavlja kot povišana v serumu bolnikov z limfomi, γ GT-gamaglutamiltransferaza je znakolestaze, ter pogosto povišana zaradi prisotnosti jetrnih metastaz, in TK-timidinkinaza, ki pomaga pri presoji razširjenosti bolezni levkemije, možganskem tumorju ali raku dojke.

Tumor spremljajoči antigeni

To je heterogena skupina označevalcev, ki zajema različne membranske strukture tumorskih celic. Označevalci, predstavniki te skupine so bolj specifični za določeno vrsto malignega tumorja kot ostali in pogosto njihove serumske koncentracije. Natančneje odražajo rast ali zmanjševanje tumorske mase. Predstavniki so:

CA15-3 karcinomski antigen. Povečane serumske koncentracije zasledimo predvsem pri bolnicah z rakastim obolenjem dojke, toda novi označevalec je povišan tudi pri drugih malignih obolenjih naprimer raku pljuč, jajčnikov, prostate... iz tega lahko sklepamo, da

CA15-3 ni specifičen tumorski označevalec ne za organ ne za vrsto tumorja. Je pa kljub temu dober pokazatelj uspešnosti zdravljenja in poteka bolezni pri bolnicah z rakom dojke. *Mucinski karcinom antigen (MCA)* označevalec značilen za rak dojke, dober za zgodnje odkrivanje ponovitve bolezni pri teh bolnicah.

Karcinom antigen 125 (CA 125) je označevalec, značilen za rak jajčnikov. Pri odraslih je prisoten v sluznici materničnega vratu in pljučnem parenhimu, zanimivo pa je, da nastaja v zdravem tkivu jajčnika. Povečane serumske koncentracije (več kot 34kU/l) najdemo razen pri bolnicah z rakom jajčnikov, tudi bolnicah z benignimi in rakastimi ginekološkimi boleznimi (ciste jajčnikov, rak materničnega vratu) ter pri nekaterih bolnikih z neginekološkimi rakavimi boleznimi ko so rak prostate, pljučni rak.

Karcinomski antigen 19/9 (CA19/9) ni niti tkivno niti organsko specifičen. Povečan je v serumu bolnikov z gastrointestinalnimi tumorji. Označevalec je sicer nekoliko bolj specifičen za rak jeter ter trebušne slinavke.

PSA (za prostato specifični antigen) je serinska proteaza, katere vloga je preprečiti koagulacijo serumske tekočine. Pri zdravih osebah preidejo v krvni obtok, količina te je zanemarljiva, vendar pri osebah z rakom prostate pa se količina le te močno poveča in s tem vsekakor tudi koncentracija v serumu.

Skupina mešanih serumskih označevalcev

Za te označevalce je značilno, da izredno dobro spremljajo spremembe v hitrosti celične proliferacije. To je heterogena skupina označevalcev, ki niso specifični za posamezne tumorje ampak na splošno nakazujejo možnost obstoja rakave bolezni. V to skupino uvrščamo nukleozide, poliamine in TPA/tkivni polipeptidni antigen. TPA je nespecifičen označevalec hitre delitve celic, nastaja v S-fazi celičnega ciklusa, njegove koncentracije pa odražajo hitrost delitve celice. (9,10)

1.3.6 Tumorski označevalec NMP22

NMP22 je protitelo proteina NuMA (nuklearni mitotični operativni encim). Je predstavnik tumorskih označevalcev, sestavljen iz kompleksne (>1000kD) in fragmentirane (30kD) oblike. NMP22 je tako glavni tumorski označevalec TCC (tumor prehodnega epitela pri raku na mehurju) ter ostalih vrst raka sečenega mehurja. V urinu zdravih oseb je NMP22 prisoten v majhnih količinah.

RF.vred.: 7.5 kU/L

2 NAMEN NALOGE

Namen našega raziskovalnega dela je osvojiti encimsko imunsko metodo, s pomočjo katere bomo določili tumorski označevalec NMP22, ki je novejši odkriti označevalec. Ta se prav tako uporablja za določanje TCC- tumorjev prehodnega epitela pri raku na mehurju.

Določali bomo koncentracijo NMP22 v urinskih vzorcih bolnikov, ki imajo motnje v delovanju sečnega mehurja. Koncentracijo tumorskega označevalca NMP22 bomo določali z dvema različnima metodama: ELISA testom, ki je klasičen encimsko imunski in kvantitativni test, ter z BladderChek presejalnim oz. screening testom je kvalitativen, katerega lahko sestra opravi tudi sama v ambulanti. Obema metodama je skupen princip imunske analize, preiskovani vzorec je urin, ter da sta za bolnika neboleči, in-vitro enostavni preiskavi. Dobljene rezultate ELISA testa ter BladderChek-a za dokazovanje NMP22, bomo primerjali z rezultati POC testa (Point of Care- test, ki ga opravimo ob preiskovancu in ne v laboratoriju) pri skupini pacientov, ki so bili naročeni na cistoskopijo. Cilj naloge je tudi vrednotenje izmerjenih rezultatov, poleg tega pa želimo predvsem ugotoviti v kolikšnih odstotkih bosta ELISA test kot tudi BladderChek potrdili prisotnost tumorja.

V naši raziskavi pričakujemo, da bodo rezultati tako ELISA testa kot BladderCheka zanesljivi ter podali visoko specifičnost in občutljivost. Dobre rezultate pričakujem tudi zato, ker obe opisani metodi v strokovni literaturi dosegata dobre rezultate.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 Opis skupine

V ambulantni urološke klinike (laboratoriju KIKKB v Ljubljani) so bili sprejeti bolniki, ki so kazali znake motenj delovanja sečnega mehurja. Ustrezno usposobljeno osebje je opravilo rutinske preglede, tako citološke kot histološke, pred citoskopijo pa je zdravnik odredil tudi določanje tumorskega označevalca NMP22, ki je vsekakor pomemben kazalec tako prisotnosti ali odsotnosti prej omenjene bolezni. NMP22 smo določali 45-im preiskovancem. V naši skupini preiskovalcev, med 45-imi pacienti je 32 predstavnikov moškega spola in 13 predstavnic ženskega spola. Iz tega je razvidno, da je v tej skupini večja populacija moških, ki imajo okvarjeno delovanje mehurja. Lahko zapišemo da gre za razmerje 2,5:1.

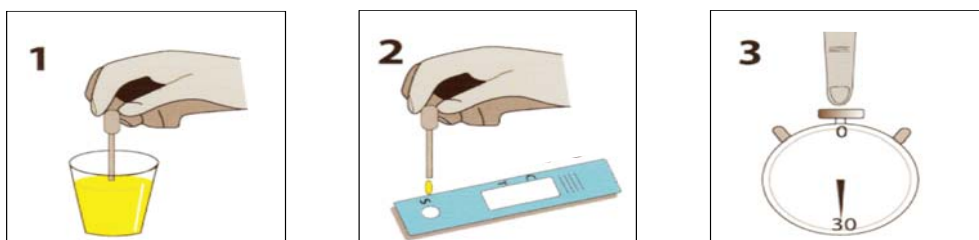
Povprečna starost 40-ih pacientov, ker pri 5-ih bolnikih nismo imeli podatke datuma rojstva, je znašala 66,33 let. Znano je, da rak sečnega mehurja sodi med deset najpogostejših rakov pri moških. Največja obolevnost je med 60 in 70-imi letom starosti, kar se kaže tudi iz naše skupine, katere povprečna starost je 66 let. Ne smemo pa se zanašati samo na ta leta, ki jih kažejo statistike, vse pogosteje obolevajo tudi mlajši, zaradi motenj delovanja sečnega mehurja, zato moramo večjo pozornost nameniti tudi mlajši populaciji ljudi.

3.2 Uporabljene metode

Uporabljeni metodi v diplomski nalogi sta BladderChek in ELISA Test, katere rezultate smo primerjali s cistoskopskimi. Spodaj (slika 9) je opisan potek BladderChek testa. NMP22 BladderChek test je kvalitativen in temelji po principu imunokromatografske metode. Test je povsem neboleč, neinvaziven in ga izvedemo s pomočjo enega samega vzorca urina. Rezultati so dobljeni po 30 minutah. Zdravi imajo na splošno zelo nizko koncentracijo NMP22 v urinu, vendar se pri bolniku z rakom sečnega mehurja koncentracija tega močno poveča.

3.2.1 NMP22 BladderChek test

KRATKO NAVODILO

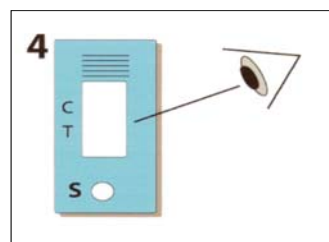


1. Pacient odda priložnostni vzorec urina v plastični lonček. Urin naj ne bo v mehurju več kot dve uri. S kateterizacijo pridobljen urin je neuporaben. Test izvedi tekom dveh ur po odvzemu. V tem času je urin lahko na sobni temperaturi (ne v hladilniku oziroma zamrzovalniku).

2. Če je testni komplet shranjen v hladilniku, naj se segreje do sobne temperature. V času doseganja sobne temperature naj bo ploščica zapakirana. Tik pred izvedbo testa ploščico odpakiraj in previdno na mesto „S” nakapaj 4 kapljice urina (brez mehurčkov).

3. Sproži štoparico.

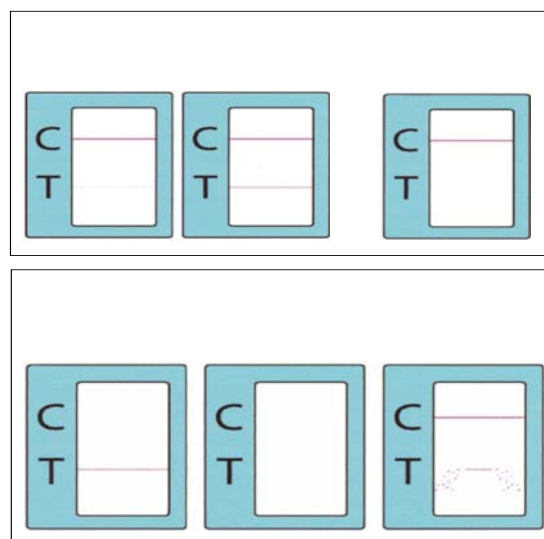
4. Rezultat odčitaj v času med 30 in 50 minut. Rezultate odčitaj kot "pozitiven" ali "negativen". V primeru nepravilnega rezultata test ponovi.



POZITIVEN rezultat je takrat, ko sta prisotni lisi C in T.

NEGATIVEN rezultat testa je takrat, ko je vidna samo lisa C.

NEPRAVILEN rezultat je vedno v primeru, ko ni lise C, oziroma je lisa T nezvezna črta.



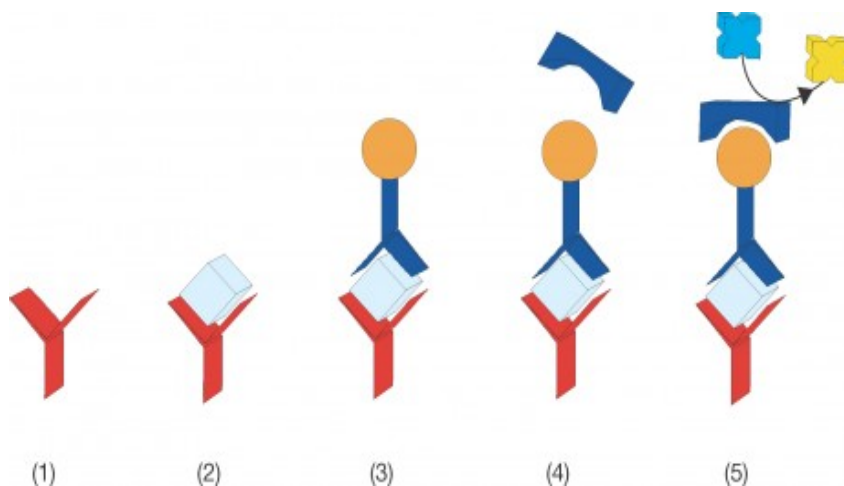
Slika 9: Opis ne-invazivnega postopka BladderChek testa

3.2.2 Princip določanja encima osnovan na direktni (sendvič) ELISA

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbet Assay) je imunoabsorpcijski test. Je heterogena metoda, podobna radioimunskemu preskusu (RIA), le da pri ELISA testu za označevanje imunskega kompleksa uporabimo encim namesto radioaktivnega izotopa.

Je ena od najbolj občutljivih in specifičnih imunskih preskusov za kvantitativno določanje, tako antigenov ali protiteles. Postopek poteka na trdem nosilcu. Antigen, ki ga dokazujemo s to tehniko, mora biti večvalenten in se mora dobro vezati tako s primarnim, kot s sekundarnim protitelesom. Spodaj slika (slika 10) ravno prikazuje potek sendvič metode in njene pogloblitve točke poteka.(9)

Pri ELISA testu je ligand antigen ali protitelo, vendar označeno z encimom.



Slika 10: Princip "sendvič" ELISA

1. na površino plošče so vezana protitelesa
2. sledi dodatek vzorca in preiskovani antigen se bo vezal na pritrjeno protitelo
3. nato dodamo detekcijsko protitelo, ki se veže na vezan antigen
4. dodamo encimsko označeno protitelo, ki se veže na detekcijsko protitelo
5. sledi dodatek substrata, ki se ob prisotnosti encima spremeni v obarvan produkt (9)

Barvno reakcijo izmerimo s fotometrom, intenziteta barve je sorazmerna koncentraciji protiteles.

ELISA je zelo uporabna metoda, za določanje številnih serumskih protiteles proti virusom rubeole, hepatitisa, HIV in drugih.

3.2.3 Princip ELISA test

Metoda, ki jo uporabljamo za določanje tumorskega označevalca NMP22, je Matritech NMP22, test ki temelji na principu encimsko imunske analize s 96 vdolbinicami na testni ploščici. Za ta encim je značilno to, da se pri malignih tkivih pojavlja kar v desetkratnih vrednostih kot v zdravih tkivih. V tej analizi, protitelesa prepoznajo glavno področje NuMA- nuklearnega mitotičnega operativnega encima. Princip določanja, temelji na encimsko imunski analizi, ki je osnovana na sendvič principu. Trdna faza, predstavljena kot prevlečena vdolbina na testnem mikrokrožniku, je prevlečena z mišjimi monoklonskimi anti-NMP22. V času inkubacije NMP22 v vzorcu reagira z imobiliziranimi mišjimi monoklonskimi anti-NMP22. Snovi, ki se niso vezale speremo, nato dodamo digoksinin anti-NMP22, ki se veže na imobiliziran NMP22. Snovi, tiste ki se niso vezale, ponovno speremo. Nato dodamo HRP-SAD reagent, ta vsebuje anti-digoksinin ki je označen z peroksidazo, sledi dodatek OPD raztopine, ki vsebuje vodikov peroksid. Med peroksidazo ter vodikovim peroksidom poteče reakcija, ki jo spektrofotometrično merimo kot spremembo barve.

3.2.4 Potek analize

Vzorci bolnikov pripravimo po točno določenih predpisih. Odvzet človeški urin je sprejemljiv vzorec, da pa je uporabljen mora biti odvzet in shranjen (stabiliziran) po navodilih Matritech NMP22 urinskega kompleta v stekleničkah:

1. Da bodo vzorci stabilni, jih moramo pred samim potekom analize shraniti na sobni temperaturi, ki se giblje med 18 in 25°C.

Sledi centrifugiranje vzorcev v plastičnih epruvetkah pri 500-1000 x G 10 do 15 min., nato pri 10-25°C odstranimo usedlino ali urinske sedimente.

Supernatant odlijemo v drug plastični zbiralnik

2. Analiziramo supernatante po postopku Matritech NMP22 Test

3. Vzorce, ki so bili centrifugirani in dekantirani, lahko za en teden pri T 2-8°C shranimo.

Če bi želeli vzorce shraniti za dalj časa, za čas 8-ih tednov, vzorce shranimo pri T -20°C, vendar pa moramo upoštevati tudi to, da lahko pride do izgube antigena. Za daljši čas pa vzorce shranimo pri T nižji od - 80°C.

4. Shranjene vzorce moramo pred testiranjem ponovno centrifugirati ter dekantirati, da bi odstranili naknadno tvorjeno oborino.

3.2.5 Vsebnost testnih kompletov

Material, ki je potreben za določanje tumorskega označevalca v urinu je oblika testnih kompletov, ki so že oskrbljeni z določenimi reagenti.

Testni kompleti vsebujejo:

CAL - NMP kalibrator, katerega kalibracijsko območje zajema koncentracijo od 0-120 U/mL NMP22 v sintetični raztopini človeškega urina, vsebuje človeški albumin, volovske proteine, fungizon ter gentamicin kot stabilizator.

CONTROL - NMP22 v sintetični raztopini človeškega urina, ki vsebuje človeški albumin, volovske proteine in fungizon.

MT PLATE - testna ploščica, mikrokrožnik prekrit z NMP22 (1x96 vdolbin, vsaka ploščica vsebuje z mišjimi monoklonskimi anti-NMP22)

DIGOX - digoksin anti-NMP22 reagent: vsebuje mišje monoklonske anti-NMP22 označena z digoksinom, kozje, mišje in volovske proteine ter konzervant Pro Clin 300.

HRP-SAD –reagent, ki vsebuje ovčji anti-digoksin mišje in volovske proteine ter Pro Cli 300 konzervant.

SAMP DIL - razredčilo za vzorce NMP22 vsebuje liofilizirano sintetično raztopino človeškega urina z človeškim albuminom, volovske serumske proteine, gentamicin

BUFFER - razvijalec barve, ki vsebuje vodikov peroksid v citratno-fosfatnem pufri s konzervantom Pro Clin 300

WASH CNC - 100x koncentrirana raztopina za spiranje vsebuje 100x koncentrat neionskega detergenta in raztopino fosfatnega pufra.

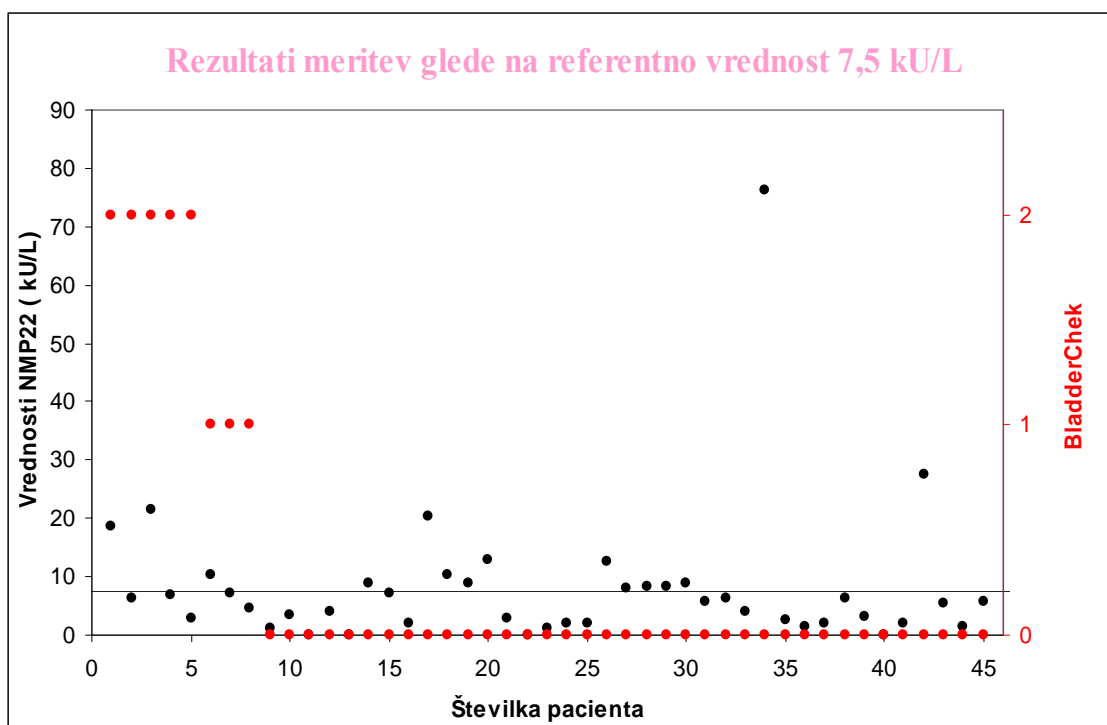
OPD - tablete, ki so posamezno zapakirane, vsebujejo 10 mg o-fenilendiamina (o-phenylenediamine). Te tablete moramo varovati pred močno svetlobo, oksidirajočimi antigeni in kovinami.

3.2.6 Postopek določanja

Testno ploščico 3x speremo s spiralno raztopino. Ploščico nato posušimo z namenom, da v vdolbinicah ne ostane nič raztopine, kajti vanje nato odpipetiramo 200 μ L kalibratorja, kontrolnega vzorca ter vzorca. Sledi dvo urna inkubacija pri temperaturi 18-25°C. Potem po inkubaciji 3x speremo testno ploščico, odpipetiramo 200 μ L digoksinin anti-NMP22 reagenta v vse testne vdolbinice. Sledi 60 min inkubacija pri 18-25°C, ponovno 3x speremo dodamo 200 μ L HRP-SAD reagenta in inkubiramo 30 min pri 18-25°C. Med inkubacijo pripravimo OPD raztopino. V plastično epruveto zmešamo OPD tableto ter razvijalec barve. Epruveto nato pokrijemo z folijo, ter shranimo na temnem prostoru. Po inkubaciji ponovno sledi 3x-no spiranje, potem dodamo 200 μ L pripravljene OPD raztopine. Med barvanjem, inkubiramo 30 min, na temnem mestu pri isti, predpisani temperaturi 18-25°C. Z dodatkom 50 μ L raztopine 2M H₂SO₄ reakcijo ustavimo. Premešamo, postavimo na temno mesto, in v obdobju 10-30 min s pomočjo spektrometra pri valovni dolžini 490 nm izmerimo rezultate.

4 REZULTATI

4.1 Razprava rezultatov



Graf 1: Rezultati meritev ELISA testa (črne točke) glede na referentno vrednost 7,5 kU/L ter rezultati BladderCheka (rdeče točke)

Statistično gledano, lahko rezultate ELISA testa, ki smo jih opravili pri 45 pacientih z sumom raka na sečnem mehurju tudi statistično opišemo oz. ovrednotimo. Med vsemi temi 45 naročenimi pacienti, ki so prišli v ambulanto urološke klinike, (laboratorij KIKKB v Ljubljani) je bilo 32 predstavnikov moškega spola in 13 predstavnic ženskega spola. Na podlagi tega števila pacientov in raziskav smo dobili rezultate ter jih ovrednotili. S pomočjo teh smo podali število pozitivnih in negativnih rezultatov ELISA testa. Z testom ELISA smo določili vrednost tumorskega označevalca NMP22, katerega referentna vrednost znaša 7,5 kU/L. Iz opravljenih preiskav smo dobili kar 35,56% (16/45) povišanih vrednosti tumorskega označevalca oz. ti presegajo postavljene referentne vrednosti, kar pomeni, da imajo veliko verjetnost, da zbolijo za rakom na sečnem mehurju. Pri preostalih 29 preiskovancih, rezultati meritev NMP22 niso presegle referentne vrednosti. Vse to pa je tudi razvidno iz zgoraj priloženega grafa, kjer črna linija, ki predstavlja referentno vrednost, ločuje pozitivne rezultate od negativnih, in nam v tem primeru omogoči orientacijski pregled rezultatov (graf 1).

Iz istega grafa, pa lahko razberemo tudi rezultate dobljene s testom BladderChek, kjer vrednost 2 poda pozitivne rezultate, teh je izmerjenih 5, ter pri 1 in 0 vrednosti dobimo rezultate, ki jih tretiramo kot negativne. Teh negativnih rezultatov je kar veliko, med katerimi dobimo tudi lažno negativne in v tem primeru lahko sumimo tudi na kakšno napako pri izvedbi testa.

4.1.1 Izračun občutljivosti in specifičnosti uporabljenih diagnostičnih testov

Na podlagi (tabele 1), kjer so razvrščeni rezultati vseh treh opravljenih raziskav, bom v diplomski delu izračunala ter podala vrednosti občutljivosti in specifičnosti uporabljenega ELISA testa in BladderChek-a.

Za lažji izračun ter vrednotenje naslednjih rezultatov opravljenih preiskav, sem spodaj podala, kako izračunati občutljivost ter specifičnost in kaj pomenita. To bom tudi v razlagi dobljenih rezultatov in razpravi uporabila.

		Rezultat diagnostičnega testa	
		+	-
Prisotnost bolezni	Bolan	PP	LN
	Zdrav	LP	PN

PP: pravilno pozitiven izid (bolni pacienti, katere test pravilno prepozna kot bolne)

LP: lažno pozitiven izid (so zdravi, vendar jih test "napačno" prepozna kot bolne)

LN: lažno negativen izid (so bolni, a test jih prepozna kot zdrave)

PN: pravilno negativen izid (so zdravi in test jih kot zdrave tudi prepozna)

Izračun: **občutljivosti diagnostičnega testa** = $PP/(PP+LN)$; predstavlja delež bolnih oseb (katere test res prepozna kot bolne) od celokupnega števila bolnih ($PP+LN$). Občutljivost je verjetnost pozitivnega testa pod pogojem prisotnosti bolezni. Manj kot je lažno negativnih rezultatov boljša je občutljivost.

specifičnost diagnostičnega testa = $PN/(LP+PN)$; je delež zdravih oseb, od celokupnega števila resnično zdravih. Specifičnost je verjetnost negativnega testa pod pogojem odsotnosti bolezni. Manj kot je lažno pozitivnih rezultatov večja je specifičnost.

točnost testa = $PP+PN/(PP+LN+LP+PN)$

Postavitev diagnoze temelji na rezultatih, ki jih dobimo s opravljenimi diagnostičnimi testi. Testi kot tudi instrumenti, ki jih uporabimo v diagnostiki lahko naredijo napako, in sicer v obe smeri- zdrave klasificirajo kot bolne in bolne kot zdrave. Zato rezultate diagnostičnih testov klasificiramo kot "pozitivne" in "negativne", pri čemer "pozitivni" imajo večjo verjetnost prisotnosti bolezni, medtem ko v kategoriji "negativni" pripišemo večjo verjetnost odsotnosti bolezni.

Tabela 1: Razporeditev rezul. ELISA testa, BladderChek-a ter cistoskopije

	ELISA TEST	BLADDER CHEK	CISTOSKOPIJA
1	+	+	+
2	-	+	+
3	+	+	+
4	-	+	-
5	+	+	+
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	+	-	+
11	-	-	-
12	+	-	+
13	+	-	+
14	-	-	-
15	-	-	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	-	-	-
19	-	-	-
20	+	-	-
21	-	-	-
22	-	-	-
23	+	-	+
24	+	-	+
25	+	-	+
26	-	-	-
27	-	-	-
28	-	-	-
29	-	-	-
30	-	-	-
31	+	-	+
32	+	-	+
33	+	-	+
34	+	-	+
35	+	-	+
36	-	-	-
37	-	-	-
38	-	-	-
39	+	-	+
40	-	-	-
41	-	-	-
42	-	-	-
43	-	-	-
44	-	-	-
45	-	-	-

Tabela 2: Prikaz pozitivnih in negativnih rezultatov, ki jih dobimo s pomočjo treh opravljenih metodah

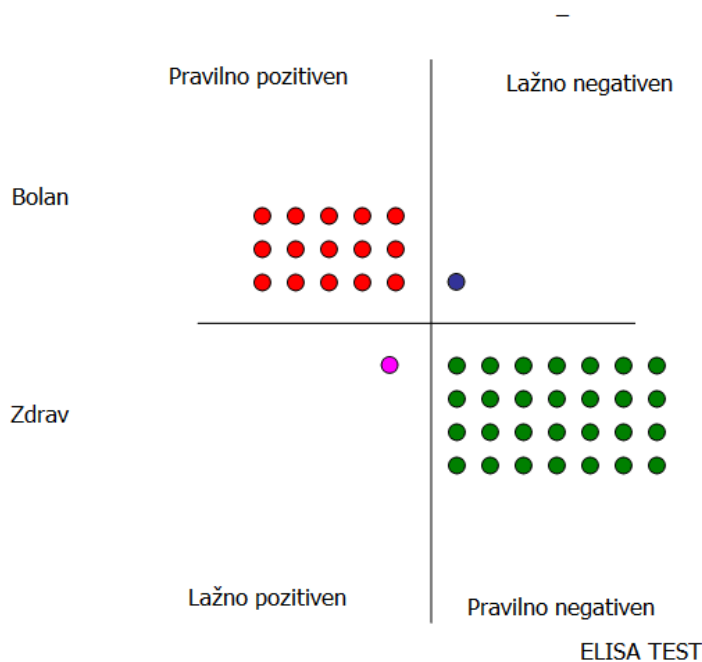
Opravljeni testi	ELISA test	BladderChek	Cistoskopija
Rezul. Pozitiven	16 (35,56%)	5 (11,11%)	16 (35,56%)
Negativen	29 (64,44%)	40 (88,89%)	29 (64,44%)

Tabela 3: Razporeditev rezultatov treh uporabljenih metod

Uporabljen test	Rezultat pozitiven	Negativen	Lažno pozitiven	Lažno negativen
ELISA	15	28	1	1
BladderChek	4	28	1	12
Cistoskopija	16	29	/	/

4.1.2 Ujemanje rezultatov ELISA testa s cistoskopijo

Če podatke ELISA testa in cistoskopskega pregleda razvrstimo le na pozitivne in negativne dobimo sledeče: iz (tabela 2) dobljenih rezultatov opravljenih preiskav, lahko razberemo, da sta tako ELISA kot cistoskopija podali enotne si rezultate. Z ELISA testom smo med vsemi 45 preiskovanimi bolniki, ki so opravili ta test dobili 35,56% (16/45) pozitivnih in 64,44% (29/45) negativnih rezultatov. Enak procent rezultatov poda tudi cistoskopski pregled (tabela2) na katerega so bili naročeni preiskovanci. Tu je predstavljena le razvrstitev rezultatov, ki smo jih pri omenjenih metodah razvrstili na pozitivne in negativne. Omeniti pa moramo tudi to, da pri ELISA testu (tabela3) med 16 pozitivnimi rezultati dobimo 15 pravilno oz. resnično pozitivnih (33,3%) in enega ki je lažno pozitiven (2,2%). Lažno pozitiven rezultat pomeni, da je ELISA test v našem primeru pozitiven, torej je preiskovanca prepoznal kot bolnega, čeprav je zdrav, saj je cistoskopski pregled dal negativen rezultat. Med 29 negativnimi rezultati dobimo 28 pravilno negativnih (62,2%) in enega, ki je lažno negativen (2,2%). Lažno negativen rezultat pomeni, da je pacient bolan (cistoskopski pregled je pozitiven), vendar ga je ELISA test v tem primeru prepoznal kot zdravega. Če primerjamo rezultate ELISA testa s cistoskopijo, vidimo da so rezultati dobri (graf 3) imamo le en lažno pozitiven in lažno negativen rezultat, tako da pričakujemo dobro občutljivost kot specifičnost. Izračunana občutljivost znaša 93,8% in specifičnost 96,6% .



Graf 2: Prikazuje porazdelitev lažno pozitivnih ter lažno negativnih rezultatov, glede na opravljen ELISA test

4.1.3 Ujemanje rezultatov BladderChek s cistoskopijo

NMP22 BladderChek je test, ki se izvede v urinu, a so rezultati dobljeni v roku 30 min. Ker je za ta test znano, da ni potrebna nobena posebna priprava pacienta, je tudi toliko bolj enostaven in predvsem za bolnike sprejemljiv, kot v primerjavi s cistoskopskim pregledom, ki je vsekakor neprijeten in predvsem boleč. Je primeren tudi kot POC test (»Point of Care«), ki ga lahko opravimo ob preiskovancu, in je potrjen s strani FDA za postavljanje diagnoze raka na sečnem mehurju. Opravljene študije so pokazale, da je boljši v detekciji karcinoma od standardnega urinskega ELISA testa. Vendar iz naših dobljenih rezultatov, ne moremo ravno sklepati, da je ta metoda učinkovita, kajti poda kar 88,9% (40/45) negativnih rezultatov in le 11,1% (5/45) pozitivnih oz. identificira le 5 pacientov z boleznijo raka na sečnem mehurju (tabela 2). Med vsemi 40-imi negativnimi rezultati dobimo 28 pravilno negativnih (62,2%) in kar 12 lažno negativnih rezultatov (26,7%), to pomeni, da bolnike BladderChek prepozna kot zdrave, a so v resnici bolni, kajti cistoskopski pregled poda vsem preiskovancem pozitiven rezultat. Med 5-imi pozitivnimi rezultati dobimo 4 pravilno pozitivne (8,9%) in 1 ki je lažno pozitiven (2,2%).

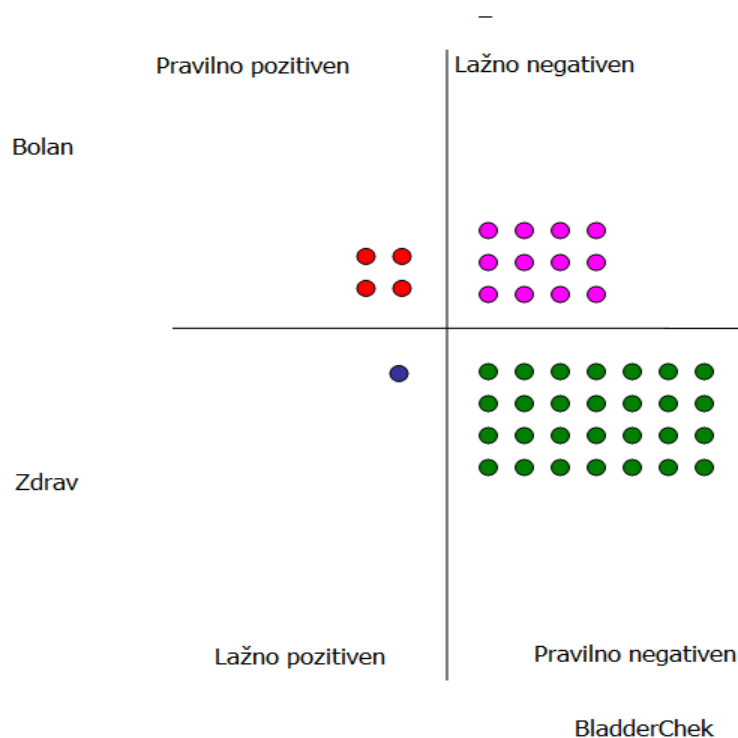
Ta lažno pozitiven rezultat našega testa pomeni, da je bolnik zdrav, a ga je test BladderChek prepoznal kot bolnega. Za tako velik odstotek lažno negativnih rezultatov, jih dobimo kar 12, se v ozadju, sklepam da skriva neka nepravilnost, ki lahko privede do tako odstopajočega rezultata. Da so rezultati slabši v tej analizi, je eden izmed vzrokov lahko tudi ta, da zdravstveno osebje ni imelo točnih navodil, kako dolgo naj bi se urin zadrževal v mehurju, ali pa se je preiskava opravila kasneje kot je predpisano. Vsi ti faktorji vsekakor vplivajo na dobljene rezultate, ki pa se jih moramo zavedati in jih predvsem upoštevati. Kot je iz grafa 4 razvidno dobimo le en lažno pozitiven in kar 12 lažno negativnih rezultatov, lahko pričakujemo dobro specifičnost ter slabo občutljivost.

Specifičnost je $PN/(LP+PN)$

$$28/(1+28)=0,966\cdot 100\% = \mathbf{96,6\%}$$

Občutljivost je $PP/(PP+LN)$

$$4/(4+12)=0,25\cdot 100\% = \mathbf{25,0\%}$$



Graf 3: Prikazuje porazdelitve lažno pozitivnih ter lažno negativnih rezultatov pri preiskavi BladerCheku

5 RAZPRAVA

Rak sečnega mehurja je bolezen, katere incidenca je po svetu in Sloveniji žal v porastu. Čeprav zboleva vse več ljudi, pa je vzpodbuden napredek pri zdravljenju, saj omogoča bolnikom boljše in kakovostnejše življenje. Vsekakor, pa se moramo zavedati vzročnih dejavnikov za nastanek bolezni, in se jim skušati v čim večji meri izogniti in živeti kar se da zdravo. Za določanje prisotnosti bolezni običajno opravimo fizikalni pregled, histološke preiskave in vedno bolj se poslužujemo tudi določanju NMP22, antigena nuklearnega mitotičnega proteina 22.

V analizo smo zajeli 45 urinskih vzorcev, v katerih smo z analizatorjem po principu encimsko imunske analize določili koncentracijo tumorskega označevalca NMP22. Za določanje tumorskega označevalca NMP22 smo uporabili dva različna testa, in sicer ELISA test ter BladderChek. Testa se med seboj razlikujeta; ELISA test je kvantitativen, klasičen test in omogoči 96 analiz opravljenih v laboratoriju. Z ELISA testom olajšamo pregled zdravniku, spremljanje zdravljenja ter pooperativno okrevanje. ELISA test poda v naši analizi zelo dobre rezultate, tudi če jih primerjamo s cistoskopskimi. Obe raziskavi podata enako število tako pozitivnih kot negativnih rezultatov. S cistoskopijo dobimo 64,44% (29/45) negativnih ter 35,56% (16/45) pozitivnih rezultatov, prav tako z ELISA testom. Pri ELISA je razlika le ta, da je med temi rezultati prisoten en rezultat, ki je lažno negativen in en lažno pozitiven. Z ELISA testom smo v tem primeru podali kar 93,8% občutljivost (dobimo le en lažno negativen rezultat) ter dosegli 96,6% specifičnost (dobimo s preiskavo en lažno pozitiven rezultat v celotni preiskavi 45 bolnikov).

Drugi test, ki smo ga uporabili je prej omenjen kvalitativni BladderChek test, ki ga lahko uporabljamo v ambulanti (sestra lahko hitro izvede ta test) ali manjših laboratorijih, kjer je število tovrstnih preiskav manjše in so tudi redkeje izvedljiva. Rezultati so dobljeni v 30 min., prednost pa je predvsem v enostavnosti in neinvazivnosti, kar pa je zelo pomembno, da je tudi neboleč za bolnika. V naši raziskavi je BladderChek podal zelo slabe rezultate kot smo jih pričakovali. Kar 88,89% rezultatov je bilo negativnih (40/45) in le 11,11% (5/45) pozitivnih. Med negativnimi rezultati dobimo kar 12 lažno negativnih, med pozitivnimi pa le enega, ki je lažno pozitiven. Za tako slabo preiskavo in dobljene rezultate se skriva napaka, sklepam da predvsem v času ko urin naj ne bi bil v mehurju več kot dve uri. Drugi vzrok pa je lahko ta, da se je test izvedel kasneje kot le dve uri po odvzetem urinu. Tukaj so navedeni morebitni vzroki, ki doprivedejo da s BladderChek-om dobimo kar 12 lažno negativnih rezultatov.

Za lažno negativne rezultate je v tem primeru značilno, da se pogosto pojavljajo tudi pri zgodnjih pojavih raka sečnega mehurja ali pa pri karcinomu, ki je počasnejše se rastoče oblike.

V našem diplomskem delu je test ELISA podala boljši rezultat kot v primerjavi s BladderChek-om. BladderChek je v našem primeru podal 96,6% specifičnost in komaj 25,0% občutljivost. Občutljivost je zelo slaba, poda zelo nizek odstotek. Te izračune in podatke, pa lahko primerjamo tudi z ROC krivuljo. Specifičnost ter občutljivost obeh uporabljenih metod lahko ponazorimo in vrednotimo tudi z ROC (receiver operating curve) krivuljo (graf 5). ROC krivulja grafično prikaže razmerje občutljivosti v odvisnosti od 1-specifičnost, kar ponazori tudi spodnji graf. Diagram bi lahko z drugo besedo predstavili tudi z razporeditvijo resnično pozitivnih rezultatov (razporejeni na ordinatno os ali y os) v odvisnosti od lažno pozitivnih (na abscisi ali x osi). V tem primeru dobimo ROC krivuljo. Diagonalna črta pod kotom 45°, deli ROC prostor. Površino med njo in krivuljo ROC imenujemo AUC (angl. area under curve- površina pod krivuljo). Popoln diagnostični test bi predstavljal površino, enako 1,00, pod ROC krivuljo, ter točke v zgornjem levem kotu v ROC prostoru, ki predstavljajo 100% občutljivost (ni lažno negativnih rezultatov) in 100% specifičnost (ni lažno pozitivnih rezultatov). Točke nad diagonalno črto kažejo dobre rezultate. Večja kot je površina pod ROC krivuljo boljša je točnost testa. V naši raziskavi in v priloženem grafu 5 imamo dve metodi, ki smo ju prikazali z ROC krivuljama.

Pri ELISA testu (krivulja prikazana z rdečo barvo) vidimo, da je površina pod ROC krivuljo velika, zato lahko tudi sklepamo in pričakujemo visoko točnost testa, ki jo bomo tudi izračunali.

Točnost testa za ELISA test:

$$\begin{aligned} (PP+PN)/(N+P) &= (15+28)/(29+16) \\ &= 0.956 \cdot 100\% = 95,6\% \end{aligned}$$

PP- pravilno pozitivni

PN- pravilno negativni

N - negativni

P - pozitivni

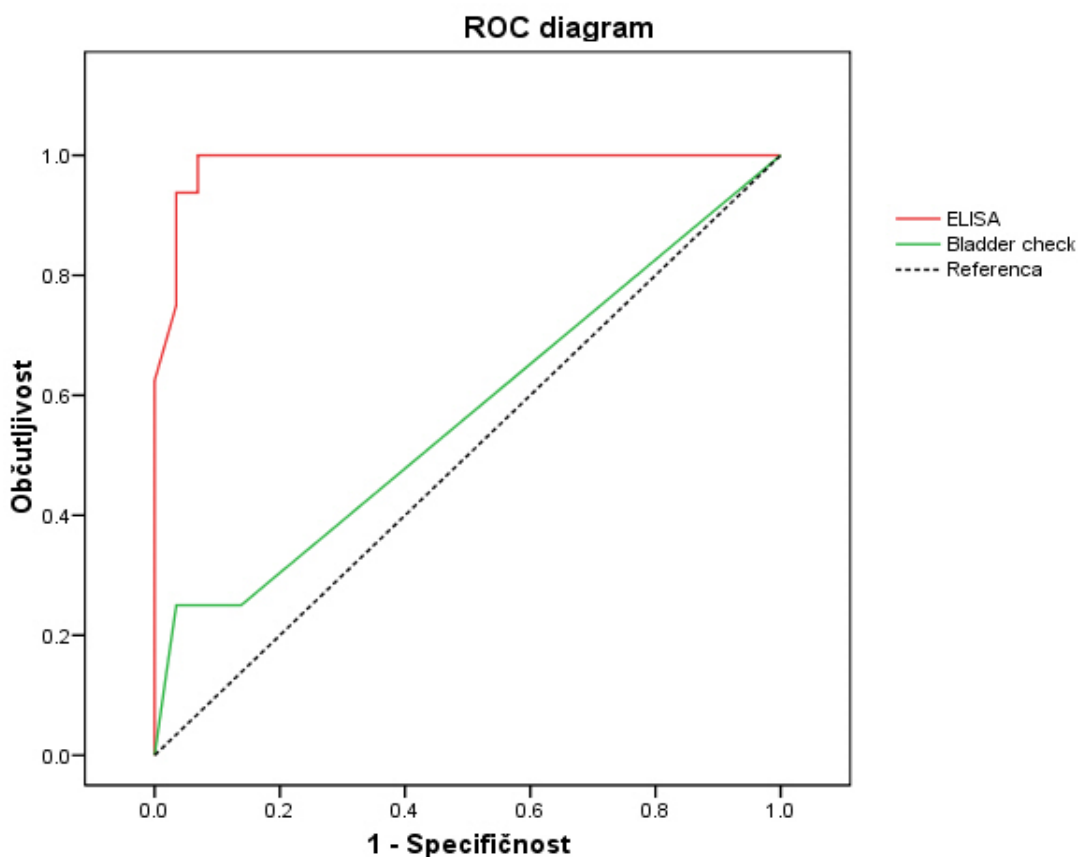
Točnost testa v našem primeru znaša 95,6%. Občutljivost in specifičnost lahko odčitamo tako, da izberemo na diagramu točko, ki je najbližja zgornjemu levemu kotu. V tem primeru odčitana vrednost za občutljivost znaša 94%, ter specifičnost ki znaša kar 96,25%.

Specifičnost smo dobili na podlagi odčitane vrednosti na ordinatni osi in nadaljnega izračuna, ki je zapisan:

Izračun specifičnosti za ELISA test je

$$1 - 0,0375 (\text{odčitana vrednost na y-osi}) \cdot 100\% = 96,25\%$$

Zelena ROC krivulja grafično prikaže rezultat metode BladderChek, kjer lahko vidimo da je AUC oz. površina med krivuljo in diagonalno črto majhna. Na podlagi tega, lahko sklepamo da bo točnost nizka, in iz izračuna dobili 71,1% točnost. Odčitana občutljivost, ki jo na enak princip odčitamo kot pri ELISA testu znaša 24%, ter specifičnost ki je enaka kot pri ELISA testu znaša 95,6%.



Graf 4: Prikazuje primerjavo specifičnosti ter občutljivosti obeh uporabljenih se metod

Tabela 4: Prikazuje odstotke specifičnosti ter občutljivosti posameznih metod

	ELISA TEST	BLADDERCHEK	CISTOSKOPIJA
SPECIFIČNOST	96,6 %	96,6 %	100 %
OBČUTLJIVOST	93,8 %	25,0 %	100 %

Vsaka analiza, tako tudi ELISA NMP22 test ima svoje dobre kot tudi slabe lastnosti.

Dobre lastnosti so :

- hiter ter zanesljiv,
- neinvazivna ter neboleča metoda (potrebujemo samo vzorec sveže odvzetega urina),
- cenovno ugoden,
- občutljiv
- opravimo 96 analiz

Slaba lastnost je ta, da se lahko pojavljajo tudi lažno pozitivni rezultati. Da se izognemo lažno pozitivnemu rezultatu, se test NMP22 ne uporablja v sledečih primerih:

- pri akutni infekciji urinarnih poti. Test se lahko v tem primeru izvede le po ozdravljeni infekciji,
- če je pri pacientu dolgotrajno prisoten nek tujek v telesu, to mislimo predvsem na npr. kateter, se NMP22 test mora izvesti 1 teden prej ali 3 tedne po ozdravljeni infekciji,
- pacient s karcinomom v urogenitalnem traktu.

Hitri test BladderChek, je namenjen določanju povišanih vrednosti antigena NMP22 v urinskih vzorcih. Test ima vgrajeno kontrolo kakovosti, potrebujemo pa za izvedbo tega, samo 4 kapljice svežega urina in rezultate odčitamo v času med 30 in 50 minut.

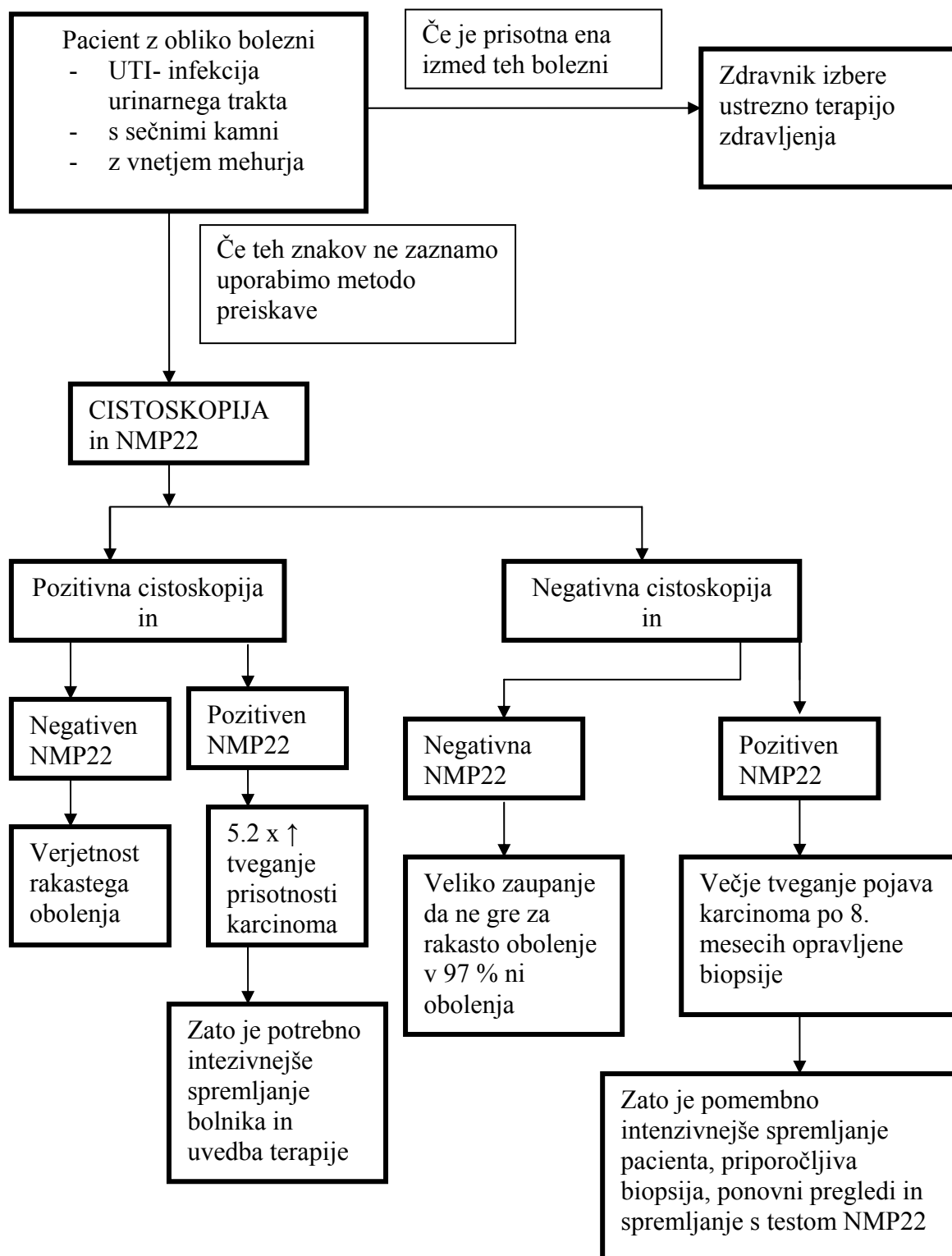
To je njegova prednost, da je hiter, predvsem pa enostaven in neinvaziven. Če pa primerjamo obe metode med seboj, s BladderChek-om lahko opravimo le eno preiskavo, medtem ko z ELISA testom kar 96 analiz.

Vsekakor pa z uporabo kombiniranih metod, tako ELISE testa in BladderCheka lahko podamo dobre rezultate, ki so tudi zanesljivi. V literaturi sta metodi opisani kot zelo dobri ter zanesljivi, vendar naša raziskava ni pokazala takšnega rezultata.

V naši raziskavi so rezultati slabi, predvsem s strani raziskave in testa BladderChek, kjer je dobljena občutljivost predstavljena v zelo slabi luči. Kar pa je bistvenega pomena za paciente, če primerjamo obe metodi ELISA testa ter BladderChek-a s cistoskopijo, je ta, da sta prvi dve metodi neboleči, predvsem hitri ter enostavni. Pacient ju lažje sprejme, kot pa cistoskopski pregled, ki je boleč in predvsem neprijeten.

Zelo pomembno je da bolniki, ki zaznajo kakršnekoli motnje z delovanjem mehurja, bodisi pekoče uriniranje gredo zdravniku. Če zdravnik pri pregledu ne zazna znakov vnetja, niti prisotnosti sečnih kamnov, bodisi vnetja urinarnega trakta, se zdravnik odloči za določanje prisotnosti tumorskega označevalca NMP22 ali cistoskopski pregled. Če sta tako cistoskopija ter ELISA test (določanje NMP22) pozitivna, gre za veliko tveganje prisotnosti rakastega obolenja. V primeru da sta obe preiskavi podali negativen rezultat, lahko rečemo z velikim zaupanjem, da ne gre za rakasto obolenje. Se pa lahko pojavijo tudi rezultati kot so, pozitivna cistoskopija in negativen NMP22, v tem primeru gre za verjetnost rakastega obolenja, v nasprotnem primeru, tudi če je negativna cistoskopija in pozitiven NMP22 se poveča tveganje pojava karcinoma po opravljeni biopsiji, zato je pomembno da bolnik redno obiskuje preglede in da zdravnik spremlja koncentracijo NMP22.

DIAGNOZA RAKA SEČNEGA MEHURJA S CISTOSKOPIJO
IN DOLOČANJEM NMP22



6 SKLEP

V naši raziskavi smo določali tumorski označevalec NMP22 s pomočjo katerega določamo rakasto obolenje na sečnem mehurju. Zanj je značilno, da ga lahko hitro, predvsem pa tudi enostavno določimo. Dobljene rezultate, naših 45-ih preiskovanih bolnikov, smo primerjali z rezultati dobljenih tako z BladderChek testom, ter s cistoskopskim pregledom.

Z Matritechovim kompletom testnih ploščic (ELISA test) smo dobili zelo dober rezultat občutljivosti 93,8% ter specifičnosti, ki je prav tako dobra, kar 96,6%. Z BladderChek testom, smo dobili presenetljivo slabši rezultat s strani občutljivosti, ki je le 25,0%, specifičnost pa znaša dobrih 96,6%.

Za učinkovitejše določanje prisotnosti bolezni, ter povišanih vrednosti tumorskega označevalca NMP22, je zelo pomembno, da uporabimo kombinacijo teh treh metod, s pomočjo katerih lahko dosežemo tako višjo občutljivost kot specifičnost. S pravočasnim odkrivanjem in spoznanjem znakov bolezni, lahko število obolelih zmanjšamo, kajti statistično gledano, število obolelih ljudi iz leta v leto narašča.

7 LITERATURA

1. Martinčič Štiblar D, Coer A, Cvetko E, Marš T: Anatomija, histologija, fiziologija, Ljubljana, Medicinska fakulteta, 2007: 143-149
2. <http://www.urologija.si/gradivo.php> (dostopno maj 2009)
3. http://www.onkologija.org/sl/domov/o_raku/rak_mehurja/ (dostopno maj 2009)
5. Lukič F: Rak ni smrt, Založništvo tržaškega tiska, Trst, 1980: 154, 157-158
4. Červek J: Rak sečnega mehurja, Okno, letnik 11, št.1., Društvo onkoloških bolnikov Slovenije, Ljubljana, 1997: 11-13
5. Borštnar S: Rak sečnega mehurja, Okno, letnik 19, št.2., Društvo onkoloških bolnikov Slovenije, Ljubljana, 2005: 7-11
6. <http://vestnik.sz.d.si/st3-s1/st3-s1-27-31.htm> (dostopno maj 2009)
7. Lukič F: Rak ni smrt, Založništvo tržaškega tiska, Trst, 1980: 154, 157-158
8. http://www.medicinenet.com/bladder_cancer/article.htm (dostopno maj 2009)
9. Osredkar J: Izbrana poglavja iz klinične kemije, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2008: 92-106
10. Novaković S: Tumorski označevalci v klinični onkologiji, Onkologija, letnik 4, št.1, Onkološki inštitut, Ljubljana, 2000: 8-14