

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

IZIDOR ŠTEFANČIČ

**KLINIČNI POMEN DOLOČANJA TIMIDIN KINAZE
IN BETA-2-MIKROGLOBULINA PRI RAZLIČNIH
HEMATOLOŠKIH OBOLENJIH**

**CLINICAL SIGNIFICANCE OF DETERMINING
THYMIDINE KINASE AND BETA-2-
MICROGLOBULIN IN DIFFERENT
HAEMATOLOGICAL DISEASES**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, praktični del diplomskega dela pa na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Kliničnega centra Ljubljana pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm. spec. med. biokem.

Zahvala gre prijaznim laborantom Kliničnega laboratorija za hematologijo na Polikliniki v Ljubljani, saj so mi s svojo strokovnostjo in skrbnostjo pripomogli h kvalitetno opravljenemu praktičnemu delu. Posebna zahvala pa gre prof. dr. Jošku Osredkarju, ki me je skozi ves čas izdelave diplomske naloge pravilno usmerjal, dajal koristne napotke in širil obzorja na področju klinične biokemije.

Vsekakor se zahvaljujem tudi svojim bližnjim pri razumevanju in podpori tekom študija.

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelal samostojno pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

Ljubljana, junij 2010

KAZALO VSEBINE

1	Uvod	1
1.1	Akutne levkemije.....	1
1.1.2	Akutna mieloična levkemija	2
1.1.3	Akutna limfatična levkemija	5
1.1.4	Non-Hodgkinov limfom (NHL)	6
1.1.5	Mielom	9
1.1.6	MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance)	12
1.2	Tumorski označevalci : biokemija in klasifikacija	13
1.2.1	Odkrivanje in uporaba tumorskih označevalcev	13
1.2.2	Nastanek tumorja.....	14
1.2.3	Biokemijske in funkcionalne značilnosti malignih procesov	16
1.2.4	Klasifikacija tumorskih označevalcev	21
1.3	Encimi, kot tumorski označevalci	25
1.3.1	Patogeneza encimskih označevalcev	25
1.3.2	Klinična uporaba	27
1.3.3	Encimi kot tumorski markerji	29
1.3.4	Drugi encimi	33
1.4	TIMIDIN KINAZA	36
1.5	β -2-MIKROGLOBULIN.....	38
2	Namen dela	42
3	Eksperimentalni del	43
3.1	TIMIDIN KINAZA	43
3.1.1	Princip metode.....	43
3.1.2	Materiali	44

3.1.3. Postopek testa	45
3.1.4. Kalibracija aparature	45
3.1.5 Opis metode	45
3.1.6 Kontrola kakovosti	46
3.2 β -2-MIKROGLOBULIN	46
3.2.1 Princip metode	46
3.2.2 Materiali	47
3.2.3 Princip testa	47
3.2.4 Opis metode	47
3.2.5 Kalibracija aparature	48
3.2.6 Kontrola kakovosti	48
4 Rezultati	49
4.1 Vzorci	49
4.2 Remisija	54
4.2.1 Rezultati določanja koncentracije timidin kinaze	54
4.2.2 Rezultati določanja koncentracije β -2 mikroglobulina	56
4.3 Relaps	57
4.3.1. Rezultati določanja koncentracije timidin kinaze	57
4.3.2 Rezultati določanja koncentracije β -2 mikroglobulina	59
4.3.3 Izračuni korelacij v remisiji	63
4.3.4 Izračuni korelacij v relapsu	65
5 Razprava	67
6 Sklep	70
Literatura	71
Priloge	74

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Število preiskovancev po starosti za NHL	49
Graf 2: Število preiskovancev glede na spol za NHL	49
Graf 3: Število preiskovancev po starosti za Mielom.....	50
Graf 4: Število preiskovancev glede na spol za Mielom	50
Graf 5: Število preiskovancev po starosti za MGUS.....	51
Graf 6: Število preiskovancev glede na spol za MGUS	51
Graf 7: Število preiskovancev po starosti za AML	52
Graf 8: Število preiskovancev glede na spol za AML.....	52
Graf 9: Število preiskovancev po starosti za ALL	53
Graf 10: Število preiskovancev glede na spol za ALL.....	53
Graf 11: Rezultati koncentracij TK v remisiji za NHL	54
Graf 12: Rezultati koncentracij TK v remisiji za Mielom.....	54
Graf 13: Rezultati koncentracij TK v remisiji za AML.....	55
Graf 14: Rezultati koncentracij TK v remisiji za ALL.....	55
Graf 15: Rezultati koncentracij B2MG v remisiji za NHL	56
Graf 16: Rezultati koncentracij B2MG v remisiji za Mielom.....	56
Graf 17: Rezultati koncentracij TK v relapsu za NHL	57
Graf 18: Rezultati koncentracij TK v relapsu za MGUS.....	57
Graf 19: Rezultati koncentracij TK v relapsu za AML	58
Graf 20: Rezultati koncentracij TK v relapsu za ALL	58
Graf 21: Rezultati koncentracij B2MG v relapsu za NHL	59
Graf 22: Rezultati koncentracij B2MG v relapsu za MGUS.....	59
Graf 23: Izračun korelacije za NHL v remisiji	63

Graf 24: Izračun korelacije za Mielom v remisiji.....	64
Graf 25: Izračun korelacije za NHL v relapsu.....	65
Graf 26: Izračun korelacije za MGUS v relapsu	66

KAZALO TABEL

Tabela 1: Morfološka FAB razvrstitev nekaterih levkemij	2
Tabela 2: Razvrstitev akutnih mieloičnih levkemij	3
Tabela 3: Imunofenotipska razdelitev limfoblastnih levkemij	5
Tabela 4: Klasifikacija tumorskih označevalcev	21
Tabela 5: Encimi kot tumorski označevalci	22
Tabela 6: Hormoni kot tumorski označevalci.....	23
Tabela 7: Drugi tumorski označevalci.....	24
Tabela 8: Encimi, ki so tumorski označevalci.....	27
Tabela 9: Mednarodni sistem razvrščanja bolnikov DP po stopnjah	39
Tabela 10: Reagenti za določanje TK.....	44
Tabela 11: Kalibratorji za določanje TK	44
Tabela 12: Reagenti za določanje B2MG.....	47
Tabela 13: Operacije analizatorja za B2MG	47
Tabela 14: Število vzorcev, povprečna vrednost in standardna deviacija vzorcev v remisiji	60
Tabela 15: Število vzorcev, povprečna vrednost in standardna deviacija vzorcev v relapsu	61
Tabela 16: Primerjave povprečnih vrednosti pri posameznih diagnozah in % povišanih vrednosti v primerjavi z referenčno vrednostjo	62

KAZALO SLIK

Slika 1: Normalen razvoj plazemske celice.....	10
Slika 2: Okvarjen razvoj B celice	10
Slika 3: Faze razvoja tumorske celice	15
Slika 4: Razvoj tumorja in določljivost z imunološkimi in biofizičnimi metodami	20

POVZETEK

Akutna mieleoična levkemija, akutna limfatična levkemija, Non-Hodgkinov limfom, mielom in monoklonalna gamopatija nedoločenega pomena so skupina hematoloških obolenj, ki jih povezuje nenadzorovana rast spremenjenih rakastih celic. Za njimi obolevajo predvsem bolniki v starejšem življenjskem obdobju, kar pa je vse prej kot pravilo, saj so dandanes določene bolezni prisotne že tudi pri mlajših.

S pomočjo določenih tumorskih označevalcev lahko ugotovimo, za katero bolezen gre, spremljamo njen potek zdravljenja in ugotavljamo morebitne ponovitve, saj so snovi, ki jih izločajo določene rakave celice, merljive. V diplomskem delu smo analizirali izmerjene koncentracije timidin kinaze (TK) in beta-2-mikroglobulina (B2MG) ter ugotovili, da ima TK povišano skupno 69,9%, B2MG pa skupno 64,8% preiskovancev.

Dobljene rezultate smo statistično obdelali in izračunali korelacijo, pri tistih boleznih, kjer je to bilo mogoče. Ugotovitve so pokazale, da med TK in B2MG ni linearne povezave ne v fazi remisije ne v fazi relapsa. Vzrok tega bi lahko bila nehomogena, premajhna skupina preiskovalcev, neinformiranost o poteku bolezni in dejavniki, ki lahko vplivajo na koncentracijo tumorskih označevalcev.

ABSTRACT

Acute myeloid leukemia, acute lymphoblastic leukemia, non-Hodgkin lymphoma, myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance all belong to a group of haematological diseases, characterized by the uncontrolled growth of changed cancer cells. The diseases normally appear in old age, however, nowadays also younger people can be affected by some of them.

Specific tumor markers serve to diagnose the disease, monitor the course of its treatment and detect possible disease recurrence, because the substances secreted by particular cancer cells can be measured. In my research, we analysed the measured concentrations of thymidine kinase and beta-2 microglobulin. It has been found out that 69,9% of the examined people had increased TK levels and 64,8% of the people had increased B2MG levels.

The results were first statistically analysed and then the possible correlation between the diseases NHL, myeloma and MGUS was calculated. The results have shown that there is no linear relationship between TK and B2MG, neither in the stage of remission nor in the stage of relapse. The reasons for such results could be the following: the group of the examined people was heterogeneous and too small; insufficient information on the course of the disease; and other factors which may affect tumor marker concentration.

SEZNAM OKRAJŠAV

Okrajšava:	Pomen:
AL	akutna levkemija
AML	akutna mieloična levkemija
ALL	akutna limfatična levkemija
TK	timidin kinaza
B2MG	beta-2-mikroglobulin
NHL	Non-Hodgkinov limfom
MGUS	monoklonalna gamopatija nedoločenega pomena
SZO	svetovna zdravstvena organizacija
Ig	imunoglobulin
AFP	alfa feto protein
CEA	karcino-embrioni antigen
DNK	deoksiribonukleinska kislina
RNK	ribonukleinska kislina
AMP	adenozin-5'-monofosfat
HCG	humani horijev gonadotropin
PAP	prostatna kislina fosfataza
PSA	prostatni-specifični antigen
LDH	laktat-dehidrogenaza
CLL	kronična limfatična levkemija
ATP	adenozin-5'-trifosfat
MDS	mielodisplastični sindrom

1 Uvod

1.1 Akutne levkemije

Akutne levkemije (AL) so heterogena skupina klonskih bolezni, ki so posledica pridobljene somatske mutacije in nato nenadzorovane rasti multipotentnih matičnih celic. Pri številnih podvrstah akutnih levkemij mutacija zajame recipročne kromosomske translokacije, katerih posledica je nov, fuzijski gen. Kromosomske translokacije praviloma zajamejo gene, ki imajo vlogo pri delitvi in dozorevanju hematopoetičnih matičnih celic. Vse levkemične celice so potomke ene same maligno spremenjene celice. Levkemične celice ohranijo sposobnost delitve, izgubijo pa sposobnost zorenja. Posledica je kopičenje maligno spremenjenih nezrelih krvnih celic v kostnem mozgu, periferni krvi in v različnih organih v telesu. Če gre za okvaro mieolične multipotentne celice, govorimo o akutni mieloični levkemiji (AML), če pa za okvaro limfatične multipotentne celice, o akutni limfatični levkemiji (ALL).

Incidenca in epidemiologija: v razvitem svetu je incidenca AL pri odraslih približno 2,4/100.000 prebivalcev in narašča s starostjo populacije. Vrh 12,6/100.000 prebivalcev doseže pri ljudeh, ki so starejši od 65 let. Pri odraslih je incidenca AML veliko večja kot incidenca ALL, obratno pa je pri otrocih. AL predstavljajo 10% vseh rakavih bolezni pri človeku in so na prvem mestu kot vzrok smrti pri bolnikih z rakavimi obolenji, ki so mlajši od 35 let.

Etiologija: pri večini AL ne poznamo sprožilnega dejavnika in govorimo o primarnih oblikah bolezni. Če je sprožilni dejavnik znan, govorimo o sekundarnih AL. Najbolj poznan dejavnik tveganja je izpostavljenost obsevanju z ionizirajočimi žarki. To je postalo znano z žrtvami atomskih bomb med drugo svetovno vojno in po njej. AL lahko nastane tudi kot posledica zdravljenja z obsevanjem pri bolnikih z ankilozirajočim spondilitisom, Hodgkinovo boleznijo in ostalimi limfoproliferativnimi boleznimi, pri bolnikih, zdravljenih s presaditvijo krvotvornih matičnih celic (PKMC), in drugih. Tudi izpostavljenost benzenu in nekaterim kemičnim spojinam, kot so fenilbutazon, arzen in kloramfenikol, poveča verjetnost za razvoj AL, kar so potrdili na nekaterih živalskih modelih.

Zdravljene s cistostatiki, predvsem alikilirajočimi, kot so melfalank lorambucil in ciklofosamid, poveča tveganje za nastanek sekundarne AL štiri do osem let po končanem zdravljenju. Tveganje je sorazmerno s celokupnim odmerkom prejetih zdravil. Kombinirano zdravljenje z alikilirajočimi cistostatiki in obsevanje, ki je pogosto pri bolnikih s Hodgkinovo boleznijo in po zdravljenju c PKMC, predstavlja najvišje tveganje za razvoj sekundarne AL. Zdravljenje AL je manj uspešno kot zdravljenje primarnih oblik bolezni.

AL se pogosteje pojavljajo znotraj nekaterih družin in so pogostejše tudi pri obeh enojajčnih dvojčkih, v kolikor zbolí eden od njiju. Bolezen se pojavi pri drugem dvojčku navadno približno leto dni zatem, ko je zbolel prvi dvojček. Zato menijo, da imajo dedni dejavniki določen, še nepojasnen pomen. Tako ALL kot AML je pogostejša pri otrocih z Downovim sindromom.

1.1.2 Akutna mieloična levkemija

AML je bolezen v mieloično vrsto usmerjene krvotvorne celice. Dejansko bolezen nastane že na stopnji multipotentne matične celice in šele kasneje začne prevladovati mieloična celična vrsta. Tako lahko imajo nekateri bolniki z AML tudi značilnosti ALL, to ugotovimo z določitvijo celičnih imunoloških označevalcev. Včasih smo takšne levkemije imenovali bifenotipske levkemije. Danes menimo, da gre za AML z limfatičnimi celičnimi označevalci in jih zato tudi zdravimo kot AML.

Razvrstitev: v preteklosti je razvrstitev akutnih levkemij, tako AML kot ALL, slonela na morfoloških in citokemičnih lastnostih levkemičnih celic. Razvrstitev je uvedla skupina francoskih, ameriških in britanskih hematologov, tj. klasifikacija FAB. Podtipi AML so bili razvrščeni v skupine od M0 do M7.

Tabela 1: Morfološka FAB razvrstitev nekaterih levkemij

Morfološka FAB (francosko-ameriško-britanska) razvrstitev nekaterih levkemij
M0: slabo diferencirana AML
M1: mieloblastna levkemija brez dozorevanja
M2: mieloblastna levkemija z dozorevanjem
M3: hipergranularna promielocitna levkemija

M4: mielomonocitna levkemija
M5a: monoblastna levkemija-slabo diferencirana
M5b: monoblastna levkemija-diferencirana
M6: eritrolevkemija
M7: megakarioblastna levkemija
L1: »otroška« ALL z majhnimi limfoblasti
L2: »odrasla« ALL z velikimi limfoblasti
L3: Burkittova levkemija z velikimi vakuoliziranimi limfoblasti
Legenda: AML – akutna mieloična levkemija; ALL – akutna limfatična levkemija

Morfološka razvrstitev je z razvojem imunoloških metod in citogenetike postala neustrezna, saj ne upošteva napovedi poteka in zdravljenja bolezni. Zato uporabljamo razvrstitev malignih krvnih bolezni, kamor sodijo tudi AL. Ta temelji na določitvi imunoloških označevalcev levkemičnih celic (imunofenotip) in na njihovih citogenetičnih nepravilnostih (kariotip).

Tabela 2: Razvrstitev akutnih mieloičnih levkemij

Razvrstitev akutnih mieloičnih levkemij (SZO)*
AML z značilnimi citogeničnimi translokacijami in onkogeni • t (8; 21): AML 1(CBFα)/ETO • t (15; 17): PML/RARα • inv16: CBFβ/MYH11 • 11q23: MLL AML z displazijo več celičnih vrst • nastala iz predhodnega mielodisplastičnega/mieloproliferativnega sindroma • nastala kot primarna bolezen AML in mielodisplastični sindrom zaradi predhodnega zdravljenja • alkilirajoči agensi • inhibitorji tropoizomerase II • ostali citostatiki

AML, ki ni drugače opredeljena ali razvrščena imunološko in morfološko
Legenda: AML – akutna mieloična levkemija, *po Svetovni zdravstveni organizaciji

Pričakujemo, da bodo v prihodnosti razvrstitve akutnih levkemij temeljile na rezultatih molekularno genetičnih preiskav.

Ključna preiskava za opredelitve podvrste AML je določitev celičnih imunoloških označevalcev s pretočnim citometrom. Med zdravljenjem na ta način lahko tudi sledimo morebitno »minimalne rezidualne bolezni« (MRB). Posebno pomembna je pri bolnikih brez ugotovljenih citogenetskih nepravilnosti. Mieloblaste označuje prisotnost CD13 in CD33 antigenov na njihovih membranah. Da lahko govorimo o »pozitivnem celičnem imunološkem označevalcu«, mora biti ta prisoten na vsaj 20 % pregledanih celic. Izraženost nekaterih označevalcev se včasih ujema z morfološko podvrsto AML (na primer glikoforin A in eritrolevkemija). Mieloblasti imajo lahko na površini poleg mieloičnih tudi limfatične celične imunološke označevalce, kot so CD2, CD5, CD7, CD10, CD19.

V krvni sliki je navadno zvečano število levkocitov, ki pa je lahko normalno ali celo znižano. Blastne celice niso vedno prisotne v diferencialni krvni sliki. Praviloma je prisotna anemija, navadno hude stopnje, in trombocitopenija. Neredko v testih hemostaze odkrijemo sindrom diseminirane intravaskularne koagulacije (DIK). DIK praviloma vedno ugotavljamo pri bolnikih z akutno promielocitno levkemijo (APL). Zaradi hitrega metabolnega obrata blastnih celic sta zvišani vrednosti encima laktat-dehidrogenaze (LDH) in sečne kisline. Pri laboratorijski določitvi elektrolitov lahko naletimo na različne nepravilnosti. Najpogosteje gre za hipokaliemijo. Napako odkrijemo, če določimo kalij v vzorcu plazme. Prav tako je lahko zmanjšana koncentracija glukoze v serumu ker blastne celice porabljajo glukozo.

Diagnozo AML potrdimo s citološko preiskavo kostnega mozga. Ta je praviloma hipercelularen in tlakovan z blastnimi celicami. Da lahko vzpostavimo diagnozo AML mora biti delež infiltracije z blastnimi celicami v kostnem mozgu vsaj 20%. V citoplazmi mieloblastov lahko vidimo Auerjeve paličice. Gre za skupek azurofilnih zrn v lizosomu mieloblastov. Zaradi praviloma enakomerne infiltracije kostnega mozga z blastnimi celicami biopsija kostnega mozga ni potrebna. Izjemo naredimo samo, kadar je punkcija

kostnega mozga suha. Diagnozo potrdimo s celičnimi imunološkimi označevalci in s citogenetično oziroma molekularno genetično preiskavo.

1.1.3 Akutna limfatična levkemija

Bolezen je posledica rakavo spremenjene limfatične celice B ali T. Če infiltracija kostnega mozga z limfoblasti ne presega 25 %, govorimo o limfoblastnem limfomu, v nasprotnem primeru pa gre za akutno limfatično levkemijo. Za razliko od ALL pri otrocih, kjer lahko povsem pozdravimo kar 80 % otrok, je dolgoročno preživetje odraslih bolnikov precej slabše. Sicer zajema ALL približno 20% vseh AL pri odraslih, medtem ko pri otrocih predstavlja najpogostejšo rakavo bolezen.

Podobno kot pri AML tudi pri ALL morfološka razvrstitev bolezni (tabela 1) nima več pravega pomena, saj na njeni osnovi bolnikov ne moremo razvrstiti v prognostične podskupine in nato ciljano načrtovati zdravljenje. Razvrstitev SZO iz leta 1997 zato bolj kot morfološke značilnosti bolezni upošteva imunofenotip in citogenetične nepravilnosti. Obe preiskavi sta tako kot pri AML ključnega pomena pri razvrstitvi bolnikov z ALL v podskupine z dobro, srednjo in slabo napovedjo poteka bolezni. Temu nato prilagodimo potek zdravljenja. Imunološki podtip, ki označuje zrelo B ALL, že ob ugotovitvi bolezni zdravimo drugače kot druge ALL.

Imunološke in citogenetične značilnosti lahko natančno določimo pri večini ALL. Imunološko ločimo med B in T celično ALL, oziroma po razvrstitvi SZO med limfoblastno levkemijo prekursorških celic B in T. Pri 75 % vseh ALL gre za B ALL in v 25% za T ALL.

Tabela 3: Imunofenotipska razdelitev limfoblastnih levkemij

Imunofenotipska razdelitev limfoblastnih levkemij
B ALL: CD19+ in/ali CD22+ in/ali CD79a+ • pro B ALL: brez dodatnih B-celičnih označevalcev • obča B ALL: CD10+, citoplazemski Ig- • pre B ALL: citoplazemski Ig+ • zrelo B ALL: membranski Ig+ in/ali citoplazemske κ ali λ+
T ALL: citoplazemski CD3+, CD7+

- pro T ALL: brez dodatnih T-celičnih označevalcev
- pre T ALL: CD2+ in/ali CD5+
- kortikalna T ALL: CD1a+
- zrela T ALL: CD3+

Za B ALL značilni celični imunološki označevalci so CD19, CD22 in CD 79a, medtem ko sta za T ALL značilna membranski CD7 in citoplazemski označevalec CD3.

Če povzamemo, so neugodni dejavniki pri bolnikih z ALL: starost višja od 55 let (nekateri postavljajo mejo 35 let), število levkocitov večje od $30 \times 10^9/L$ pri B ALL oziroma večje od $100 \times 10^9/L$ pri T ALL, imunofenotip bolezni pro B in pro T, neugodna citogenetika, kar

najpogosteje pomeni prisotnost t(9;22), organomegalija, močno povečane bezgavke in več kot štiri tedne zdravljenja za doseg popolne remisije bolezni.

Klinična slika je podobna kakor pri AML, obstaja pa nekaj posebnosti. Povečane bezgavke, jetra in vranico vidimo pri polovici bolnikov, kar je pogostejše kakor pri AML. Pri 10–15 % bolnikov lahko vidimo tudi povečan timus na pregledni sliki prsnega koša. Levkemični infiltrati v osrednjem živčevju in posledična nevrološka simptomatika nastanejo pri 5–10 % bolnikov, vendar redko ob postavitvi diagnoze. Zrela B ALL (Burkittova levkemija) lahko nastane kot posledica okužbe z virusom HIV. Laboratorijske značilnosti se ne razlikujejo od tistih pri AML, včasih lahko v periferni krvni sliki limfoblaste zamenjamo za celice visokomalignih limfomov. Diagnostični postopek je enak kot pri AML.

1.1.4 Non-Hodgkinov limfom (NHL)

Glede na izvor maligne celice, histologijo, klinično sliko, potek in prognozo, SZO deli vse maligne limfome (ML) na:

- Non-Hodgkinove limfome (NHL),
- Hodgkinov limfom (HB),
- neklasificirane limfome.

Takšni maligni limfomi so novotvorbe zrelih celic B, T in naravnih celic ubijal (NK). Nastanejo zaradi trajnega samostojnega razraščanja celic limfatičnega tkiva. ML so klonske bolezni, ki nastanejo z maligno preobrazbo ene celice limfocitne vrste T ali B ali NK. Lastnosti te celice se prenašajo na vse potomke. Maligno celico večinoma primerjamo glede na morfološke in imunološke značilnosti celične membrane in citoplazme s posamezno stopnjo v normalnem razvoju celic limfatične vrste in jo po njej poimenujemo.

ML najpogosteje prizadenejo bezgavke, vranico, nebnici in kostni mozeg, zaradi velike razširjenosti limfatičnega tkiva pa tudi vse druge organe. Nekateri ML so dolgo časa omejeni, drugi pa se hitro razširijo v kostni mozeg in kri ter dajo levkemično klinično sliko. Zaradi tega jih je včasih težko ločiti od levkemije. Za napredovale ML je značilna okrnjena imunska odzivnost.

Non-Hodgkinovi limfomi (NHL) so:

- nezreli limfom B
 - limfoblastni limfom B
- periferni limfom B
 - drobnocelični limfocitni limfom
 - limfoplazmocelični limfom
 - ektranodalni limfom marginalne cone
 - plazmocitom
 - folikularni limfom
 - limfom plaščnih celic
 - difuzni velikocelični limfom B
 - Burkittov limfom
- nezreli limfom T
 - limfoblastni limfom T
- zreli (periferni) limfomi T /NK
 - levkemični: limfomi T odraslih
 - ektranodalni: fungoidna mukoza/Sezory-jev sindrom
 - nodalni: periferni limfom T

Incidenca Non-Hodgkinovih limfomov variira od 3,7 do 15,5/100.000 prebivalcev. V ZDA in zahodnih evropskih državah prevladujejo B-celični limfomi, ki predstavljajo od 85 do 90 odstotkov vseh NHL. Enako velja za Slovenijo. Najpogostejša histološka podtipa NHL sta difuzni velikocelični B-limfom in folikularni limfom, ki sta v letu 2004 predstavljala 34,9 oziroma 16,4 odstotka vseh novo odkritih NHL v Sloveniji. Pogostnost zbolevanja za Ne-Hodgkinovimi limfomi iz leta v leto narašča. V obdobju od leta 1975 do 1991 je v ZDA naraščala za 3,6 odstotka, v obdobju od leta 1991 do 2003 pa za 0,4 odstotka na letni ravni. V Sloveniji je bila incidenca NHL v obdobju 2000–2004 za 22,1 odstotka višja kot v obdobju od leta 1995 do 1999.

Vzrok je večinoma neznan, vendar pa nastanek nekaterih limfomov povezujejo z genetskimi napakami, dejavniki okolja in infekcijskimi agensi. Ljudje s pomanjkljivim imunskim sistemom imajo 25 % tveganje za nastanek limfoma. Med infekcijskimi agensi so znani EBV, HTLV-1 virus, HHV-8, HCV in *Helicobacter pylori*. Incidenca NHL je večja pri kmetih, izpostavljenih herbicidom in pri ljudeh, katerih hrana je bogata z mesom in maščobami.

Splošni znaki: dolgotrajna povišana temperatura nad 38°C brez jasnega razloga, nočno potenje, izguba več kot 10 % telesne teže v zadnjih 6 mesecih. Povečane bezgavke: najprej so pogosto povečane periferne bezgavke (neboleče, čvrste, premakljive); povečajo se tudi bezgavke v mediastinumu (asimptomatske / pritisk na dihalne poti / pritisk na zgornjo veno kavo) in retroperitonealno (asimptomatske / pritisk na spodnjo veno kavo, limfne poti, sečevod). Povečanje vranice in jeter: bolečine pod levim in desnim rebrnim lokom. Znaki prizadetosti nelimfatičnih organov: nevrolški izpadi zaradi pritiska povečanih mediastinalnih ali retroperitonealnih bezgavk na korenine hrbtenjačnih živcev, okužbe, avtoimunski pojavi. NHL se v 1/3 primerov pokaže s prizadetostjo kože (vnetja, nekroze ...), prebavil, ščitnice, Waldeyerjevega obroča.

Klinični stadiji:

Stadij I:

- I = prizadeto eno področje bezgavk (I.E)
- I.E = omejeno prizadet en nelimfatičen organ oz. tkivo

Stadij II:

- II = prizadeti dve ali več skupin bezgavk na isti strani prepone

- II.E = omejeno prizadet en nelimfatičen organ oz. tkivo in ena ali več skupin bezgavk na isti strani prepone

Stadij III:

- III = prizadete bezgavke nad in pod prepono
- III.E = sočasno omejeno prizadet še en nelimfatičen organ oz. tkivo
- III.S = sočasno prizadeta še vranica
- III.E.S = sočasno omejeno prizadet še en nelimfatičen organ oz. tkivo in tudi vranica

Stadij IV:

- difuzno ali diseminirano prizadet en ali več nelimfatičnih organov, samostojno ali skupaj z bezgavkami

Diagnoza bolezni temelji na razgovoru z bolnikom, njegovih preteklih boleznih, pregledu in nizu diagnostičnih analiz. Ocena razširjenosti pa temelji na analizi vzorca limfatičnih tkiv. Po postavitvi diagnoze, ki je pridobljena z imunofenotipizacijo in citogenetsko analizo, sledijo naslednje preiskave: KKS (kompletna krvna slika), jetrni testi, določanje kreatinina, sečnine, LDH (laktat dehidrogenaza), pljučni rentgen, CT/NMR (računalniška tomografija/nuklearna magnetna resonanca) glave, vratu, trebuha, medenice, PET (pozitronska emisijska tomografija), FDG-PET (PET z fluorodeoksiglukozo F 18), scintigrafija z galijem, scintigrafija skeleta, številne punkcije kosti, pregled cerebrospinalnega likvorja, kromosomske in molekularne analize ter določanje beta-2-mikroglobulina, da se ugotovi stopnja in širjenje bolezni.

1.1.5 Mielom

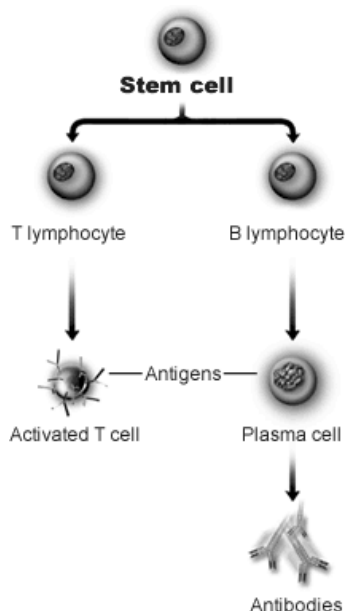
Mielom je rak plazemskih celic, je neozdravljiv, vendar ga je moč obvladovati. Te celice sodijo v skupino belih krvničk, ki jih imamo v kostnem mozgu. Pri multiplem mielomu gre za veliko število nenormalnih plazemskih celic in tako masovno produkcijo monoklonalnih imunoglobulinov IgG, IgA, IgD, IgE ali Bence-Jones proteina (prosti monoklonski κ in λ lahki verigi). Posledice se kažejo kot hiperkalcemija, slabokrvnost, poškodba ledvic, povečana dovzetnost bakterijskih okužb ter okvara produkcije normalnih imunoglobulinov. Pogostokrat je karakterizirana z difuzno osteoporozo v medenici, hrbtenici, rebrih in lobanji.

Normalni potek razvoja plazmatk in tvorbe imunskega sistema: celice so usmerjene v nastanek imunskih celic tako kot vse druge krvne celice, ki nastajajo v kostnem mozgu iz matičnih celic. Nekatere matične celice se razvijejo v majhne bele celice, imenovane limfociti. Dva glavna razreda limfocitov so B-celice (B-limfociti) in T-celice (T-limfociti). Plazma celice (plazmatke) pa se razvijejo iz B-celic.

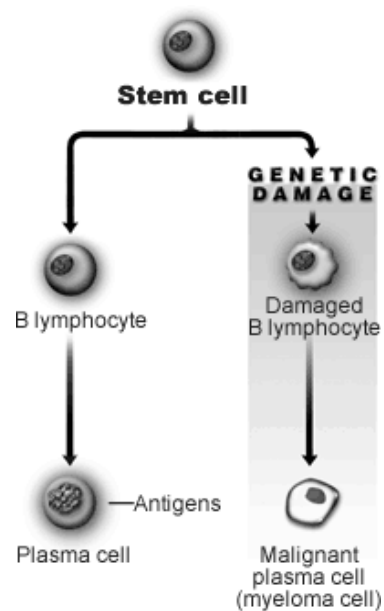
B-limfociti potujejo v bezgavke, kjer dozori in nato potujejo po telesu. Ko tuje snovi (antigeni) vstopijo v telo, B-celica pošlje ukaz plazmatkam za produkcijo imunoglobulinov (protiteles) za pomoč pri boju proti infekciji in bolezni.

Razvoj maligne plazemske celice: pri normalnem postopku se ob imunskem odzivu sprožijo B-celice, ki začnejo proizvajati plazmatke. Preoblikovanje normalne B-celice v maligne plazmatke vključuje več stopenj, ki zajema več genetskih anomalij. Končni rezultat je nastanek maligne plazemske celice, kjer se ta nenadzorovano množi in ustvarja množico malignih plazmatk.

Ti mielomi celice potujejo skozi krvni obtok in se zbirajo v kostnem mozgu, kjer povzročijo trajno poškodbo zdravemu tkivu.



Slika 1: Normalen razvoj plazemske celice



Slika 2: Okvarjen razvoj B celice

Pri multiplem mielomu gre za okvaro B-celice, ki proizvaja povečano število plazmatk – mieločnih celic. Te maligne celice ne delujejo pravilno, saj začno proizvajati imunoglobuline istega razreda, ki pa jih telo ne potrebuje pri zmanjšanem nastajanju normalnih imunoglobulinov. Na ta način ločimo različne vrste mielomov. Najpogostejša sta mieloma imunoglobulinskih razredov IgG (60-70 %) in IgA (cca. 20 %). IgD in IgE pa se pojavljata redkeje.

Leta 2003 se je International Myeloma Working Group dogovorila o diagnostičnih merilih za simptomatski in asimptomatski mielom ter MGUS (monoklonska gamopatija neopredeljenega pomena);

- simptomatski mielom:
 - pozitiven M-protein v serumu ali urinu
 - klonske plazemske celice kostnega mozga ali biopsija z dokazanim plazmocitomom
 - katerikoli mielom povezanih organov ali okvarjenih tkiv
- asimptomatski mielom:
 - serumski M-protein >30 g/L
 - serumski M-protein >30 g/L
 - klonske plazemske celice kostnega tkiva >10 %
 - brez mieloma povezanih organov ali okvarjenih tkiv
- MGUS:
 - M-protein <30 g/L
 - klonske plazemske celice kostnega tkiva <10 %
 - brez mieloma povezanih organov ali okvarjenih tkiv
 - ni dokazov o drugih B-celičnih proliferativnih motnjah

Mednarodni sistem za stopnjevanje multiplega mieloma:

- faza 1
 - serum β_2 mikroglobulin < 3.5 mg/L
 - serum albumin $\geq 3,5$ g/dL

- mediana preživetja 62 mesecev
- faza 2
 - serum beta₂-mikroglobulin < 3,5 mg/L in serum albumin < 3,5 g/dL
 - serum beta₂-mikroglobulin 3,5 do 5,5 mg/L in katera koli stopnja albumina
 - mediana preživetja 44 mesecev
- faza 3
 - serum beta₂-mikroglobulin ≥ 5,5 mg/L
 - mediana preživetja 29 mesecev

1.1.6 MGUS (*monoclonal gammopathy of undetermined significance*)

Pri monoklonalni gamopatiji neopredeljenega pomena gre za proizvodnjo M-proteina (protitelesa) nerakastih plazemskih celic, kjer so načeloma odsotni znaki, značilni za multipli mielom. Gre za prevlado klonskih plazemskih celic v kostnem mozgu z nenormalnim imunofenotipom (CD38+, CD56+, CD19–) skupaj s celicami normalnega fenotipa (CD38+, CD56–, CD19+). Tako je pri MGUS prisotnih več kot 3% klonskih plazemskih celic z normalnim fenotipom, medtem ko je pri multiplu mielomu teh celic manj kot 3%.

Kaj povzroči, da se MGUS spremeni v multipli mielom, pa do sedaj še ni znano. Podobnost sorodnih bolezni in multiplu mieloma je v zmanjšanem številu protiteles ter zmanjšanem številu plazemskih celic (bele krvne celice, ki proizvajajo protitelesa) v kostnem mozgu.

MGUS je navadno asimptomatska in neprogresivna bolezen, pojavlja se pri navidezno zdravih ljudeh in tako se lahko pojavi tudi periferna nevropatija. Večina primerov je v začetku benignih, vendar pa jih skupno 25 % oz. 1% letno napreduje v mielom ali motnje razvoja B-celic, kar privede do bolezni, kot so makroglobulinemija, amiloidoza ali limfoma. Povezana je lahko z non-limforetičnimi tumorji (karcinom prsi, žolčnika, GI-trakta, ledvic, prostate), kroničnimi vnetji in infekcijskimi stanji (holecistitis, osteomielitis, pielonefritis, revmatoidni artritis, tuberkuloza) in z ostalimi boleznimi, kot so (familiarna hiperholesteroloemija, Gaucherjeva bolezen, Kaposijev sarkom, myxedematozusovi lišaji, jetrne motnje, miastenia gravis, perniciozna anemija, tirotoksikoza).

Diagnoza se po navadi postavi na podlagi naključne prisotnosti M-proteina, pri laboratorijski analizi krvi ali urina. Koncentracija je zelo nizka in znaša <3 g / dl v serumu ter <300 mg/24 h v urinu. MGUS se razlikuje od drugih bolezni plazemske celice, ker raven M-proteina ostaja stabilna in tako ne prihaja do nastanka anemij in motenj v delovanju ledvic, se pa kažejo znaki v zmanjšani kostnini ter posledično povečanih zlomih. Tako je potrebno izvesti denzitometrijo kosti in opraviti izhodiščno oceno o stanju skeleta, v kostnem mozgu pa se kaže le blaga plazmocitoza ($<10\%$ jedrne celice).

Zdravljenje z antineoplastično terapijo odsvetujejo. Nedavne študije so pokazale, da se bolniki z MGUS in povezano izgubo kostnine (osteoporoza ali osteopenia) odzivajo na zdravljenje z difosfonati. Bolnikom priporočajo opraviti klinično oceno ter serumsko in urinsko proteinsko elektroforezo za napredovanje bolezni.

1.2 Tumorski označevalci : biokemija in klasifikacija

1.2.1 Odkrivanje in uporaba tumorskih označevalcev

V zadnjih dvajsetih letih je znanost na področju biomedicine nepričakovano napredovala in prav tako tudi na področju tumorskih označevalcev ter spremljanju malignih procesov. Bence-Jones je leta 1946 opisal pogrezanje proteinov v nakisanem urinu pri pacientu z multiplim mielomom. Ta lahka veriga monoklonskega imunoglobulina je prvi identificiran označevalec karcinoma, ki se klinično uporablja vse do danes. Med letoma 1928 in 1963 je Bence-Jones odkril številne hormone, encime, izoencime in druge proteine, katerih koncentracija se spreminja v telesnih tekočinah tekom malignega procesa. Tako se je npr. kislja fosfataza uporabljala kot označevalec karcinoma prostate od l. 1930 do l. 1990. Leta 1963–1965 so odkrili dva tumorska označevalca in sicer alfa-feto protein – AFP (za hepatom) in karcinoembrioni antigen – CEA (za kolorektalni karcinom), ki se intenzivno koristi tudi danes. (Majkić-Stingh 2006, 79)

Leta 1960 je bila dodeljena Nobelova nagrada za odkritje radioimunskega določanja, kar je omogočilo specifično in občutljivo določanje majhnih količin snovi v bioloških tekočinah in prav tako leta 1975, ko je bila Nobelova nagrada podeljena za odkritje monoklonskih protiteles. Ta tehnologija je omogočila odkritje številnih novih tumorskih označevalcev, vključno z ogljikohidratnimi antigeni CA125, CA 15.3, CA 19.9. Leta 1980 je bil odkrit prostatni specifični antigen (PSA) kot eden najboljših tumorskih označevalcev.

Med letoma 1970 in 1980 se uvedejo novi koncepti določanja onkogenov in tumorskih supresornih genov, kot so: rekombinantna DNK tehnologija, PCR (polymerase chain reaction), avtomatsko zaporedje in ostale molekularne tehnike, ki so omogočile enostavno analiziranje DNK in mRNK na področju molekularne diagnostike karcinoma.

Danes poznamo na stotine tumorskih označevalcev, ki lahko imajo prognostični značaj. Vendar glede na številne izjeme posameznih tumorskih označevalcev le-ti nimajo zelo velikega pomena za določanje. Kljub temu pa so tumorski označevalci zelo značilni za spremljanje učinkovitosti terapije in za predvidenje odgovora na terapijo. Vrsta tumorskih označevalcev je omejena na področju skrininga, diagnostike, prognoze, določanja stopenj in lokacije tumorja. To pomeni, da je večina tumorskih označevalcev uporabnih predvsem za spremljanje terapije in da jih je samo del koristnih za rano odkrivanje rakavosti. Celo prostatni specifični antigen (PSA), ki je najkoristnejši tumorski označevalec, ima omejen klinični pomen zaradi nespecifičnega povišanja v primerjavi z benignostjo prostate hiperplazije (BPH).

Predpostavljajo, da bodo nova znanja v pogledu sekvence človeškega genoma, odkritja vseh genov, vseh proteinov v rekombinantnih oblikah, celularne lokalizacije vseh proteinov, funkcije proteinov, proteinske strukture v 3-dimenzionalnih nivojih, biokemijskih reakcij, opredeljenih reagentov za proteine, odgovarjajočih protiteles, vseh enakovrednih nukleotidnih polimorfizmov človeškega gena, mutacij karcinoma (somatskih in naslednjih), bioinformatike in umetne nevronske mreže (ANN pomeni, da posnemajo delovanje nevronov v človeških možganih. Prednost modela ANN je, da se je sposoben na podlagi številnih kliničnih primerov naučiti, kakšen bo potek in izhod bolezni pri določenih značilnostih karcinoma) omogočile boljše razumevanje nastanka in ozdravljenje karcinoma.

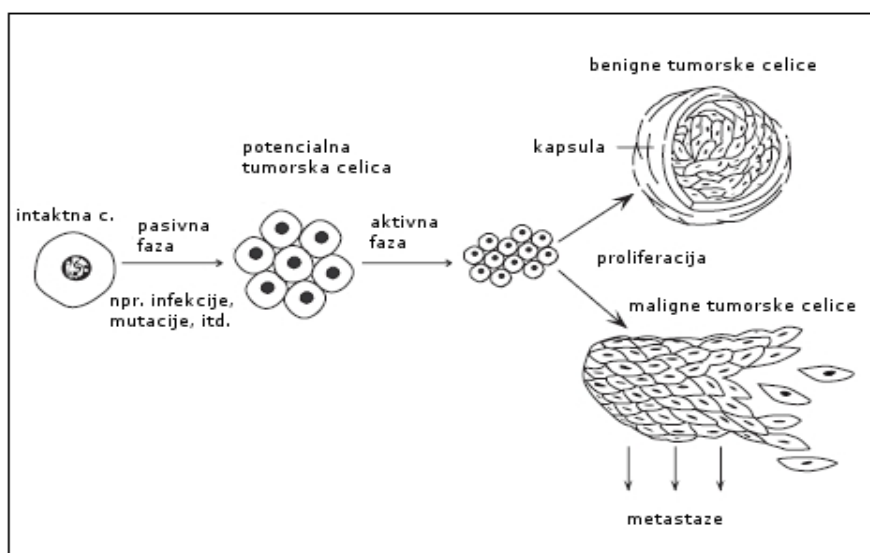
1.2.2 Nastanek tumorja

Pravijo, da je rak bolezen devetdesetih let. V ekonomsko razvitih predelih sveta zavzemajo maligni tumorji drugo mesto v strukturi umrljivosti, takoj za kardiovaskularnimi boleznimi. Frekvenca malignih tumorjev se giblje v širokih mejah, glede na genetsko dediščino, življenjsko dobo, spol, mesta nastanka in različne faktorje okolja. Zaradi visokih

ekonomskih standardov vsak peti človek umre zaradi raka, pri čemer se ena četrtna malignih tumorjev ozdravi.

Razen fizioloških sprememb se lahko v celici pojavijo tudi maligne spremembe, ki se lahko razlikujejo od ostalih zaradi hitre nekontrolirane rasti. Pod takšnimi pogoji se pojavljajo nove snovi ali pa se povečuje koncentracija že obstoječih. Snovi, ki jih ustvarjajo tumorji, se imenujejo »tumorski označevalci« in njihove povečane koncentracije v serumu nakazujejo na maligne procese v organizmu.

Na sliki je prikazano nastajanje tumorskih celic iz normalne diferencirane celice zaradi vpliva različnih faktorjev, kar privede do nekontrolirane diferenciacije in rasti celic. Čeprav so poznane razlike med normalnimi in malignimi celicami, pa še danes niso poznani biološki razlogi, zakaj pride do kancerogenih sprememb. Menijo, da hkrati deluje več faktorjev, kot so kemijski, fizični, genetski in defekti v imunskem sistemu. Zelo pogosto se pojavljajo posamezne degenerirane celice v organizmu, ki so prepoznane in uničene s pomočjo intaktnega imunskega sistema. Maligna obolenja so najpogostejši vzrok smrti takoj za kardiovaskularnimi boleznimi, kjer se smrtnost zaradi obolenja povečuje iz dneva v dan.



Slika 3: Faze razvoja tumorske celice

Kot je vidno na sliki, kjer se celice ponovno delijo, se ta skupina celic razmnožuje v tumor (lat. tumor = tumor, oteklina), ki je lahko ali benigni ali maligni. Benigni tumor je podoben zdravemu tkivu in raste počasi z normalno delitvijo celičnih jeder. Takšni tumorji so

obdani z vezivno tkivno kapsulo in ne vodijo do pojava metastaze (do razsajevanja). Za razliko od benignih tumorjev rastejo maligni zelo hitro in ireverzibilno. Razlikujejo se od okoljskih tkiv, celice so nediferencirane in rastejo v okoljska tkiva ter niso obdane z vezivno tkivno kapsulo. Njihova rast je torej destruktivna in infiltrirajoča v okoljska tkiva.

Posamezne celice se lahko oddvojijo in potujejo po organizmu, kar privede do pojava metastaz na mestih, ki so oddaljena od primarnega tumorja. Pri tem umre največje število celic. Tumorske celice imajo sposobnost vezave na stene krvnih žil in njihove rasti v okoljska tkiva in to predvsem v tista, skozi katere pospešeno teče kri (npr. pljuča, jetra). Benigni in maligni tumorji se ločijo tudi po histološki sliki, ki je pri benignih tumorjih tipična in diferencirana, pri malignih pa atipična in polimorfna.

Tumorski označevalci se imenujejo vse snovi, ki jih producira sam tumor, sem spadajo tudi proizvodi metabolnih procesov tumorjev. To so snovi, ki nastajajo v tumorskih celicah in se izločajo v različne telesne tekočine, njihova kvantitativna določljivost pa je omogočena z različnimi neinvazivnimi biokemijskimi metodami.

Uporaba tumorskih označevalcev v klinični onkologiji traja od konca šestdesetih let. Danes je v primerjavi veliko število občutljivih in specifičnih tumorskih označevalcev, ki so v direktni povezavi z eno ali več histološko različnih neoplazmami. Njihova uporaba je lahko koristna v zgodnji diagnostiki malignih tumorjev v predkliničnem stadiju, spremljanju razvoja predrakavih lezij in malignih procesov ter odkrivanju recidivov v prognozi bolezni.

1.2.3 Biokemijske in funkcionalne značilnosti malignih procesov

- Onkogeni in tumorski supresorni geni

V organizmu se v času življenja deli zelo veliko število celic, hkrati pa prihaja s tem tudi do napak in posledičnih mutacij. Veliko število malignih neoplazem se razvija iz mutirajočih celičnih klonov in večina človeških neoplazem je monoklonalnega izvora. Ena spontana mutacija ni zadostna za nastanek malignega tumorja, marveč je potrebno večje število mutacij v isti »liniji« celic. Da bi si zagotovile obstanek v organizmu, morajo maligne celice imeti določene prednosti v odnosu do zdravih celic, do katerih prihaja z genetskimi spremembami v seriji zaporednih mutacij.

Posebno mesto pri reševanju maligne alteracije celic predstavlja izum onkogenov, ki ga sestavlja skupina 50 od skupaj 50.000 genov, ki ga vsebuje človeški genom. Onkogeni so mutantni aleli protoonkogenov, nastali na njihovih mutacijah. V nekaterih primerih ima protoonkogen lastnost onkogenov, predvsem kadar pride v virusni genom pod kontrolo promotorja, ki stimulira njegovo izražanje. Produkti onkogenov so proteini, ki sodelujejo v zapletenih mehanizmih transmisije signala v celici in kontroli njene rasti, razvoja in diferenciacije. Produkti onkogenov so protein kinaze, polipeptidni faktorji rasti, G-proteini in regulatorni nuklearni proteini. Ugotavljajo, da morajo biti onkogeni produkti ali »transformirajoči proteini« trajno prisotni, da lahko celice obdržijo maligno transformacijo, kar pomeni neprestano vzpodbujanje celičnega razvoja.

Poseben pomen v ekspresiji neoplastičnega programa celic se pripisuje rastnim faktorjem (epidermalni, trombocitni, transformirajoči idr.). Odgovor celic na rastne faktorje se odvija v fazah s točno določenim redom. Prvo fazo v procesu zajema prenos signala povzročenim faktorjem rasti in njihovo vezavo na specifični receptor na celični membrani, kar povzroča alosterično spremembo receptorja. Tako spremenjen receptor se prerazporedi v notranjost membrane ali pa se poveže z ostalimi membranskimi proteini in tako prepušča številne sestavine v celico: encime, proteine celičnega skeleta, faktorje transkripcije, proteine, ki se vežejo na DNK in encime, ki usmerjajo predhodnika deoksi in ribonukleotid proti replikaciji DNK. Aktivnost celičnih onkogenov na nivoju DNK se odvija s spremembo primarne strukture ali mutacije, amplifikacije in translokacije onkogenov. Neoplazma tako postaja kaotičen sistem, v katerem se permanentno odvija selekcija celičnih klonov največjega malignega potenciala. Uporablja se ogromen genetski celični potencial, kjer neoplazma izvaja ekspresijo tistih genov, ki ji bodo omogočili prilagoditev v stalno spremenljivih pogojih mikrosredine z nepredvidljivim razvojem in aktivizacijo izbranih genov.

- Biokemijske značilnosti malignih celic

Maligno tkivo ima nestabilen dinamični sistem, v katerem ne doseže stabilnega in stacionarnega stanja tako kot pri zdravih tkivih. Tekom razvoja neoplastičnega programa postajajo maligne celice kompetitivne normalnim celicam, ki ne morejo obstati v njihovi

okolici. Encimske in metabolične spremembe znotraj maligne celice niso brez reda, kvečjemu predstavljajo »biokemijsko strategijo« neoplazme.

Maligne celice se biokemijsko znatno razlikujejo od normalnih celic, čeprav ne obstaja specifičen encimski ali metabolični profil, ki bi značilno določal neoplazmo. Visoka aerobna glikoliza je najpogostejše prisotna biokemijska značilnost malignega tkiva. V malignih celicah je povečana sinteza proteinov, hkrati pa zmanjšana, oziroma odsotna aktivnost encimov, ki so v povezavi s specifičnimi celičnimi funkcijami. Maligne celice uspešneje sprejemajo različne metabolite, kot so glukoza, glutamin in drugi, hkrati pa izrazito povečanje kolagenaze pogojuje destruktivnost in povečuje sposobnost infiltracije v okolje. Zaradi zmanjšane števila mitohondrijev imajo maligne celice zmanjšano zmogljivost dihanja. V zgradbi mitohondrijev malignih celic se nahajajo drugačni tipi membranskih proteinov in lipidov, kar vpliva na hitrejše pripajanje in slabše odvajanje kalcijevih ionov. To povzroča zmanjšano aktivnost encima peroksid-dismutaze, ki pogojuje spremembo celičnega redoks statusa in povečanje peroksidacije lipidov. V malignih celicah je povišana aktivnost glukoze-6-fosfat dehidrogenaze in izražena metabolična pot glukoze tekom ciklusa pentoze-fosfata. Prevladujejo celični procesi anaerobne glikolize, ki zagotavljajo celicam vir energije. V njih se ustvarja višek laktata, kar povzroča intracelularno acidozo in aktivacijo lizosomalne hidrolize.

V jedrih malignih celic je povečana sinteza DNK in povišana aktivnost encimov, kot so ligaza, nukleaza in DNK-polimeraza. Povišana je tudi aktivnost encima timidin-kinaze in citidin-fosfat sintetaze, ki pogojno pogojujejo povečano sintezo nukleotidov kot prekurzorjev nukleinskih kislin. Zaradi kvalitativnih sprememb se v transkripciji pojavljajo informacijski RNK (i-RNK) za onkofetalne proteine. Prav tako je stimulirana tudi sinteza poliamina, katerega funkcija je zelo pomembna za rast celic, sineto DNK, RNK, proteinov in modifikacije transportne RNK (t-RNA).

Celična membrana malignih celic se zelo razlikuje od membrane zdravih celic. Zadrži lahko večjo količino holesterola ter manj nenasičenih maščobnih kislin in glikolipidov. Spremenjena je tudi sestava membranskih glikoproteinov in glikolipidov. Normalni antigeni celične membrane izginejo in se pojavijo specifični tumorski antigeni, kot so: karcinoembrionalni, površinski in transplantacijski antigeni.

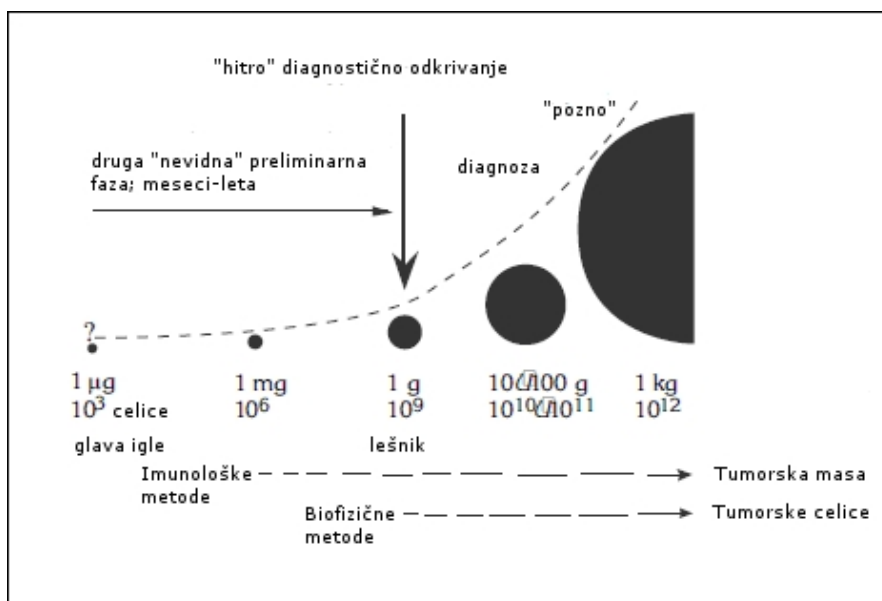
Zaradi pomanjkanja fibronektina in glikozil-transferaze je zmanjšana adhezivnost malignih celic, kar olajšuje sproščanje celic in njihovo metastatsko razsejevanje. Zmanjšana aktivnost adenil-ciklaze povzroča zmanjšanje koncentracije cAMP-ja, kar vpliva na spremembe v sintezi in izgradnji citoskeleta malignih celic, njihovi obliki, gibljivosti, adhezivnosti in hitrosti rasti. Biokemijske spremembe znotraj malignih celic privedejo do kvantitativnih in kvalitativnih sprememb različnih sestavin telesnih tekočin v organizmu, kar vpliva na patološke spremembe biokemijskih meritev v krvi in urinu.

Na površini celic prav tako prihaja do pogostih izmenjav, na osnovi katerih je mogoče razlikovati maligne celice od normalnih diferenciranih celic. To pomeni, da na površini celic nastajajo novi antigeni, med tem ko so se ostali antigeni izgubili. Do menjave pride tudi pri glikoproteinski strukturi celične membrane, kar privede do izmenjave v transportu in permeabilnosti celične membrane. Znotrajcelična komunikacija med tumorskimi celicami je slabša kot pri skupini normalnih celic, kar povzroča spremembo adhezivnosti in kontaktne inhibicije. Tako izmenjane celice ustvarjajo in izločajo snovi, ki jih imenujemo tumorski označevalci, ki jih lahko razvrstimo med: antigene, hormone, serumske proteine in encime.

- Funkcionalne značilnosti malignega procesa

Prvo stopnjo v razvoju maligne neoplazme predstavlja prenehanje normalnih celičnih funkcij in razvoj njihove avtonomije. Maligna celica, kot njena osnovna funkcija, usmerja vso svojo energijo v rast in proliferacijo. Pomembno je, da celice pridobijo lastnost invazivnosti in metastaziranja, da bi imel tumor lastnosti malignosti. Proces metastaziranja je najboljšje predstavljen v sledečem primeru: na vsakih 1000 tumorskih celic se loči le ena celica, samo 1 na 1000 celic preživi pot skozi krvne in limfne žile do mesta metastaziranja. Matematično gledano je samo 1 od milijon malignih celic sposobna, da postane baza nadaljnega metastaziranja. Glede na rezultate preiskav je samo 1 od 10.000 malignih celic sposobna tvoriti osnovo za novo tumorsko kolonijo, hkrati pa po 24 urah po prehodu v cirkulacijo preživi samo 0,1% malignih celic. Razlog za to je verjetno srečanje tovrstnih celic z mononuklearnimi fagociti, citotoksičnimi T-limfociti in celicami NK, kot tudi mehanske poškodbe, do katerih prihaja pri prehodu skozi ozke krvne kapilare.

Kritičen trenutek v razvoju maligne neoplazme predstavlja rast do takšne velikosti, ki onemogoča obstoječi vaskularizaciji zagotovljeno oksigenacijo in priliv prehranskega materiala za nadaljnji razvoj malignega tkiva. Pri solidnih tumorjih obstaja prevaskularna faza, kjer tumor raste počasi in linearno glede na čas in kjer poteka prehranjevanje ter oksigenacija pod pogojem difuzijskega procesa. Primer je »karcinom in situ«, kjer je število celic okoli 1 milijon in velikost okoli 1 milimeter. Nadaljnja rast tumorja je odvisna od angiogeneze in neovaskularizacije, kjer je lahko hitrost rasti eksponentna in lahko tumor doseže 1–2 cm v premeru. Glede na klasične diagnostične metode, kot so: x-žarki, ultrasonografija in računalniška tomografija, je tumor najlažje odkrit, kadar le-ta doseže velikost lešnika ali ima težo 1 grama ali pa vsebuje 10^9 tumorskih celic. Glede na tumorske označevalce se z imunološkimi metodami »in vitro« da tumor najhitreje odkriti, kadar vsebuje 10^6 (1 milijon) celic ali pa je težak 1 mg. V toku dolgotrajne rasti lahko pretečejo meseci in leta, preden je tumor odkrit, kar lahko pomeni, da lahko pričakujemo metastaze in znatno slabšo prognozo o poteku bolezni.



Slika 4: Razvoj tumorja in določljivost z imunološkimi in biofizičnimi metodami

Večina bolnikov ne umre zaradi posledic, ki jih izziva primarni tumor, temveč zaradi več vzrokov, ki povzročajo metastaze tega tumorja. Zaradi tega razloga je zaželeno, da je primarni tumor odkrit kar se da zgodaj. Na sliki je prikazan razvoj tumorja in možnost njegovega odkrivanja s pomočjo imunoloških in biofizičnih diagnostičnih metod.

1.2.4 Klasifikacija tumorskih označevalcev

V tabeli 4 je prikazana klasifikacija tumorskih označevalcev, ki temelji na osnovi tistih snovi, ki jih proizvajajo tumorji sami in snovi, ki spremljajo ta proces.

Tumorji proizvajajo snovi, ki se delijo na sintetične in metabolično aktivne. V sintetične spadajo: onkofetalni antigeni, ektopični (nenormalni) antigeni in onkoplacentni antigeni.

Za diagnozo tumorjev so zelo značilni onkofetalni antigeni. Tukaj govorimo o antigenih, ki se normalno sintetizirajo v nekaterih celicah v toku embrionalnega ali fetalnega razvoja. Pri zdravih odraslih osebah se nahajajo v zelo nizkih koncentracijah, pri bolnikih z malignim tumorjem pa se koncentracija znatno poveča. Najbolj znani snovi sta karcinoembriogeni antigen (CEA) in alfa-1-fetoprotein (AFP).

Spremenjeni metabolizem tumorskih celic privede do sinteze nekaterih spojin, ki ne nastajajo v normalnih celicah. Pravimo jim ektopični proizvodi in tukaj govorimo zlasti o encimih glikolize, biosintezi proteinov in biosintezi nukleinskih kislin. Te snovi imajo med drugim razmeroma nizko specifičnost, kar zmanjšuje njihovo diagnostično vrednost.

Tabela 4: Klasifikacija tumorskih označevalcev

TUMORSKI OZNAČEVALCI			
A. Molekule, ki so proizvod tumorja		B. Spojine, katere sledijo malignemu procesu	
A.1. Sintetični proizvodi	A.2. Metabolični proizvodi - aktivne substance	B.1. Spremenjeni serumski parametri zaradi vpliva tumorja	B.2. Encimi, ki se pojavijo v cirkulaciji tumorja
- onkofetalni	- encimi		
- ektopični	- hormoni		
- onkoplacentarni antigeni	- metaboliti		

Določeni tumorji proizvajajo molekule, ki pod normalnimi fiziološkimi pogoji nastajajo edino v placenti. Govorimo o tako imenovanem onkoplacentarnem sintetičnem proizvodu,

od katerih so najbolj poznani humani horiogonadotropin (HCG) in specifični β -1-glikoprotein (SP1).

V drugi skupini so novo nastale snovi, ki sledijo tumorjem. Med te spadajo drugi serumski parametri in številni proteini, ki nastajajo več ali manj v sekundarnem teku malignega procesa. Glede na to, da so manj specifični, se uporabljajo kot dodatni, fakultativni označevalci, ki kažejo na maligni proces in omogočajo spremljanje obolenja. Sem spadata npr. feritin in β -2-mikroglobulin.

Encimi in izoencimi so redko specifični za odgovarjajoči tumor. Povečujejo se z rastjo tumorja in/ali metastatsko infiltracijo v zdravo tkivo. Od encimov je pomembna prostatica kislina fosfataza, ki se povečuje pri primarnem karcinomu prostate in γ -glutamyltransferaza, ki se povečuje pri primarnem karcinomu jeter in metastaziranju v jetrih. Od drugih parametrov je potrebno omeniti nekatere molekule, ki trpijo sekundarne spremembe in so nekateri antigeni (npr. komponente krvnih skupin CA19-9 in CA 12-5).

Tabela 5: Encimi kot tumorski označevalci

Encim	Tip karcinoma
Alkohol dehidrogenaza	Jetra
Aldolaza	Jetra
Alkalna fosfataza	Kosti, jetra, levkemija, sarkom
Alkalna fosfataza - placentarna	Ovarijumi, pljuča, trofoblastni gastrointestinalni seminom, Hodgkin
Amilaza	Pankreas, različni tipi
Aril - sulfataza B	Kolon, dojke
Kreatin kinaza - BB	Prostata, pljuča (male celice), dojke, kolon, ovarijumi
Esteraza	Dojke
Galaktoziltransferaza	Kolon, mehur, gastrointestinalni, različni tipi
γ -glutamyltransferaza	Jetra
Heksokinaza	Jetra
Laktat-dehidrogenaza	Jetra, limfomi, levkemija, različni tipi

Levcin-aminopeptidaza	Pankreas, jetra
Nevron-specifična enolaza	Pljuča (male celice), nevroblastom, feokromocitom
5'-nukleotidaza	Jetra
Prostatna kislj fosfataza	Prostata
PSA	Prostata
Piruvat kinaza	Jetra, različni tipi
Ribonukleaza	Različni tipi (ovarijumi, pljuča)
Sijalitransferaza	Dojke, kolon, pljuča
Terminalna deoksitransferaza	Levkemija
Timidin kinaza	Različni tipi, levkemija, limfomi, pljuča (male celice)

Tabela 6: Hormoni kot tumorsku označevalci

Hormon	Tip karcinoma
ACTH	Cushingov sindrom, pljuča (male celice)
Antidiuretični hormon	Pljuča (male celice), nadledvična žleza, pankreas, duodenum
Bombesin	Pljuča (male celice)
Kalcitonin	Medularna tireoidea
Gastrin	Glukagonom
Rastni hormon	Ledvice, pljuča, pituitarni adenom
hCG	Embrionalni, horiokarcinom, testikularni (nonseminomi)
Človeški placentarni laktogen	Trofoblastni, gonade, pljuča, dojke
Nevrofizni	Pljuča (male celice)
Paratiroidni hormon	Jetra, ledvice, dojke, pljuča, drugi tipi
Prolaktin	Pituitarni adenom. Ledvice, pljuča
Vazoaktivni intestinalni peptid	Pankreas, bronhogeni, feokromocitom, nevroblastni

Pričakovati je bilo, da bo spoznanje zaporedja človeškega genoma in identifikacija vseh genov omogočila razkritje tistih genov, ki so različni ali pa na skrivaj izraženi pri nekem

karcinomu. Takšna poznavanja so potrebna, da omogočimo napovedovanje individualnih predispozicij pri karcinomu in razvoj taktične učinkovite preventive v pogledu diete, načina življenja, hemopreventive itd.

Tumorski označevalci morajo ustrezati sledečim karakteristikam, da lahko koristijo pri diagnosticiranju malignih procesov: 1) morajo biti v jasni povezavi z malignim procesom, 2) so v korelaciji z tumorsko maso, 3) ponujajo informacijo o tipu tumorja, njegovi lokalizaciji in stopnji razvitosti, 4) kažejo na primerno terapijo, ki bi jo bilo smotrno koristiti in 5) omogočajo prognozo. Tumorski označevalci redko služijo za zgodnje odkrivanje bolezni, predvsem zaradi slabe specifičnosti in določljivosti.

Tabela 7: Drugi tumorski označevalci

Citokeratini
Tkivni polipeptidni antigen (TPA)
Tkivni polipeptidni-specifični antigen (TPS)
Citokeratin 19 fragment (CYFRA 21-1)
Antigen karcinoma skvamoznih celic (SCCA)
Proteini kot tumorski označevalci
β 2-mikroglobulin (označuje multipli mielom, kronične limfocitne levkemije)
C-peptid (označevalec inzulinoma)
Feritin (označevalec karcinoma jeter, pljuč, dojke in levkemije)
Monoklonski imunoglobulin (označevalec multiple mieloma, limfoma)
Protrombinski prekurzor (označevalec hepatocelularnega karcinoma)
BTA (ang. Bladder tumor associated) označevalec tumorja mehurja
Tiroglobulin (Tg) (tumorski označevalec tiroidnih karcinomov)
Antitiroglobulinska protitelesa (Anti-Tg)
Protein S-100 (označevalec melanoma in njegovih metastaz)
Avtoprotitelesa (na različne antigene, ki jih proizvajajo tumorji)

Kromogranini A (CgA), B (CgB) in sekretogranin II, III, IV in V.
Receptorji in drugi označevalci
Estrogeni (ER)
Progesteronski receptorji (PR)
Androgeni receptorji (AR)
Receptor hepatocitnega faktorja rasti (HGF)
Receptor epidermijskega faktorja rasti (EGFR)

1.3 Encimi, kot tumorski označevalci

Encimi spadajo v prvo skupino koriščenih tumorskih označevalcev. V proteinski sestavi tumorja imajo encimi, kot dobri tumorski označevalci, pomembno vlogo pri diagnostiki in zdravljenju malignega obolenja pri ljudeh, glede na to, da vzdržujejo metabolne procese v tumorjih.

Merjenje encimov je relativno enostavno z uporabo spektrofotometriškega določevanja encimske aktivnosti. Leta 1950 je s pomočjo radioimuno določevanja prvič omogočeno merjenje encima kot proteinskega antigena namesto katalitične aktivnosti. Vendar pa, razen nekaterih izjem, povečanje aktivnosti ali mase encima ali izoencima ni dovolj specifična ali določljiva za identifikacijo tipa karcinoma ali specifičnega vključevanja nekega organa. Eden od takih je PSA, ki ima zmerno proteazno aktivnost in homologno aminokislinsko zaporedje (sekvenca) in odgovarja serin proteazam družine kalikrein. Kaže se pri normalni, benigni, hiperplastični in kancerozni prostati in zelo malo v drugih tkivih. Vse do odkritja PSA kot označevalca karcinoma prostate je bila popularnost encima kot označevalca znatno manjša. Encimi so zlasti uporabljeni kot tumorski označevalci pri odkrivanju onkofetalnih antigenov in monoklonskih protiteles. Patologija encima kot označevalca karcinoma je predstavljena v obliki fetalnega encima ali izoencima ali ektopične produkcije encima.

1.3.1 Patogeneza encimskih označevalcev

Vse somatske celice imajo enak nabor genov. V teku ontogeneze se nekateri geni vključujejo (zaradi depresije) in drugi izključujejo (zaradi represije). V teku normalnega

procesa diferenciacije normalnih celic se pod vplivom genov vzpostavlja zaporedje, ki je specifično za vsako vrsto celic. Proučevanja encimov in izoencimov so v tumorskih celicah pokazale razliko pri izražanju genov med normalnimi in tumorskimi celicami. Spremembe profilov encimov in izoencimov v malignih tumorjih se dandanes opišemo na več načinov in iz tega sledijo naslednje teorije:

- Teorija brisanja – izginjanje encimov in izoencimov znotraj tumorskega tkiva povzroča izginjanje esencialnih proteinov v tumorju. V tej teoriji ni mogoče pojasniti kvantitativnih sprememb encimov in izoencimov ter njihovega ponovnega pojavljanja v tumorskem tkivu, čeprav se fiziološko ne nahaja v normalnem odraslem organizmu. Teorija anaerobne glikolize – gre za glikolitski pojav encimov in izoencimov s poudarkom, da je anaerobna glikoliza pogostokrat zelo povečana v tumorjih, ni pa povečana pri vseh tumorjih.
- Teorija pritekanja – pričakovano je, da se fenotipski profil encimov in izoencimov ujema z izvirnim tkivom, iz katerega je zrastel tumor, vendar pa je danes obče znano, da se encimski profil lahko znatno razlikuje od izvirnega tkiva.
- Teorija molekularne korelacije – spremembe encimskih in izoencimskih profilov pri rasti tumorja, ki so vezane na rast tumorja ali spremembe, ki so vezane na preoblikovanje tumorja. Pri takšnih stanjih potekajo sintetični in degradacijski procesi, ki vplivajo na spremembe encimskega profila.
- Teorija disdiferenciacije – pomeni, da se spremembe v genski sestavi kažejo v celicah tumorja in njihovem fenotipu. Nastale spremembe se tudi razlikujejo od tistih v normalnih celicah. Pogostokrat so encimi, ki so nastali na ta način, fenotipsko podobni tistim v fetalnih tkivih. Torej patološki encimi in izoencimi nastajajo zaradi represije ali derepresije ustreznih genomov v toku karcinogeneze. Pogostokrat se v tumorskih celicah nahajajo tudi fenotipi encimov in izoencimov, ki so enaki organu, ki je sosednji tumorju.
- Teorija dediferenciacije – pojasnjuje način ponovnega pojavljanja encimov ali izoencimov v tumorskih celicah, ki so obstajali v času fetalnega življenja. Normalno se po rojstvu zaradi procesa represije ustavi proizvodnja takšnih proteinov, medtem ko pri malignih tumorjih prihaja do biosinteze fetalnih encimov

in izoencimov v neoplastičnih celicah. Posledica takšnega procesa je pojav tako imenovanega »karcino-embrionalnega proteina«, ki se nahaja tako v fetalnih ali placentarnih organih kot tudi v malignih tumorjih.

1.3.2 Klinična uporaba

Encimi se v celicah nahajajo v visokih koncentracijah, kadar le-ti prehajajo v cirkulacijo nekroze tumorja ali pa kadar prihaja do sprememb v permeabilnosti celic karcinoma. Povečani nivoji encimskih aktivnosti se pojavljajo zaradi zaprtja pankreasnih in biliarnih poti ter renalne insuficience. Večina encimov tako ni značilna za samo en organ. To pomeni, da so encimi najugodnejši kot nespecifični tumorski označevalci, kajti njihova prisotnost kaže na prisotnost malignega procesa.

Izoencimi in multiple oblike encimov omogočajo še dodatno organospecifičnost. Navadno se v glavnem meri aktivnost encimov, čeprav je z uporabno protiteles mogoče merjenje tudi antigenskih lastnosti encima kot proteina. V tabeli so prikazani primeri nekaterih encimov, ki so tipični za določeno vrsto karcinoma, kot tudi postopki določanja.

Tabela 8: Encimi, ki so tumorski označevalci

Encim	Dokazovanje	Tip karcinoma
Alkohol dehidrogenaza	Akt	Jetra
Aldolaza	Akt	Jetra
Alkalna fosfataza	Akt	Kosti, jetra, levkemija, sarkom
Alkalna fosfataza – placentna	Akt	Ovariji, pljuča, seminom, Hodgkin
Amilaza	Akt	Pankreas, različni tipi
Aril sulfataza B	Akt	Kolon, dojke
Kreatin kinaza BB	Akt	Prostata, pljuča (male celice), dojke, kolon, ovariji
Esteraza	Akt	Dojke
Galaktoziltransferaza	Akt	Kolon, mehur, gastrointestinalni
γ -glutamilttransferaza	Akt	Jetra

Heksokinaza	Akt	Jetra
Laktat dehidrogenaza	Akt	Jetra, limfomi, levkemija, različni tipi
Levcin aninopeptidaza	Akt	Pankreas, jetra
Nevron-specifična enolaza	RIA, EIA	Pljuča (male celice), nevroblastom, karcinoidni, melanom, feokromocitom, pankreas
5'-nukleotidaza	Akt	Jetra
Prostatna kisl fosfataza	Akt/IMA	Prostata
PSA	Akt	Prostata
Piruvat kinaza	Akt	Jetra, različni tipi
Ribonukleaza	Akt	Različni (ovarji, pljuča)
Terminalna deoksitransferaza	Akt	Levkemija
Timidin kinaza	RIA/Act	Različni, levkemija, limfomi, pljuča (male celice)

Neglede na potencialne možnosti dandanes ni prišlo do intenzivne rabe encimov in izoencimov za primarno diagnozo ali spremljanje tumorjev. Glavni razlogi za to so:

- večina encimov in izoencimov, ki se sintetizirajo v tumorskem tkivu, se ne izloča v serum. Torej to pomeni, da se spremembe, ki se nahajajo v tumorju, ne prenašajo v serum;
- samski encimi in izoencimi se nahajajo v serumu v tako majhnih koncentracijah, da jih ni mogoče odkriti z običajnimi metodami;
- večina encimov se normalno nahaja v različnih organih, tako da ni mogoče potrditi, ali se encim nahaja fiziološko v določenem organu ali pa izhaja iz tumorja, in
- do sedaj še ni bila izvedena biokemijska klasifikacija tumorja, ki bi slonela na podlagi encimov in izoencimov, ki izhajajo iz malignega tkiva. (Majkić-Stingh 2006, 129)

1.3.3 Encimi kot tumorski markerji

Aktivnosti encimov se merijo z običajnimi metodami, najpogosteje s pomočjo fotometričnih metod. Izoencime pa analiziramo na več načinov: elektroforetsko, kromatografsko na koloni, z izoelektrofokusiranjem, s semi-kvantitativnimi postopki, ki temeljijo na inhibiciji in denaturaciji izoencimov, imunološkimi postopki, radioaktivnimi postopki itd. Vsi postopki, ki se sicer uporabljajo za analiziranje encimov, služijo tudi za določanje encimov v primeru malignega tumorja. Aktivnost se določa v serumu, blatu in urinu.

Alkalna fosfataza izhaja iz jeter, kosti in placent. V serumu zdravih oseb se primarno nahaja alkalna fosfataza iz jeter ali biliarnega trakta. Povišani nivoji alkalne fosfataze se nahajajo v primarnem ali sekundarnem karcinomu jeter. Določanje nivoja alkalne fosfataze je značilno za oceno metastatskega karcinoma kosti in jeter. Da bi se določili vzroki, ki privedejo do povišanja alkalne fosfataze, se morajo določiti tudi ostali encimi, kot sta npr. 5'-nukleotidaza in γ -glutamyltransferaza. Z določanjem izoencima alkalne fosfataze se dodatno poveča specifičnost analize. Placentalna alkalna fosfataza (PALP) se sintetizira v trofoblastu in je povišana pri nosečnicah. PALP je prvič identificiran kot Reganov izoencim leta 1968, ko je uvrščena med onkorazvojne označevalce skupaj z AFP in CEA. Povečana je pri različnih malignih stanjih, vključno z karcinomom pljuč in ovarijev, pri trofoblastnih in gastrointestinalnih karcinomih, seminomih in Hodgkinovem obolenju.

Kreatin kinaza (CK) katalizira fosforilacijo kreatina z adenozin-trifosfatim. CK je dimer, sestavljen iz M (mišične) in B (možganske) podenote. Ima tri izoencime CK1 (BB), CK2 (MB) in CK3 (MM). CK1 se nahaja v možganih, prostati, gastrointestinalnem traktu, pljučih, sečnem mehurju, uterusu in placenti. V srčni mišici je najbolj zastopan izoencim CK2. CK3 pa se nahaja v srčni in skeletnih mišicah.

Povišan nivo CK1 se nahaja v karcinomu prostate in karcinomu malih pljučnih celic. Izoencimi CK so vključeni v paleto karcinomov prostate pod imenom »ProstASURE« .

Laktat dehidrogenaza (LD) je encim glikolize, tako da je njeno povišanje rezultat poškodb celic. Povišanje aktivnosti LD v malignih stanjih je dokaj nespecifično in se nahaja pri številnih karcinomih, vključno z jetrnim, pri non-Hodgkinovem limfomu, akutni levkemiji, seminomu, nevroblastomu, karcinomu dojke, kolona, želodca in pljuč. Nivo aktivnosti LD v serumu je v korelaciji s tumorsko maso pri čvrstih tumorjih, kar je dobra prognoza pri

razvoju bolezni. Tako se na primer povišanje izoencima LD5 kaže pri metastazah na jetrih, pa tudi pri likvorju, ko je metastaziranje prisotno na centralnem živčnem sistemu.

Enolaza je glikolitični encim in je poznana kot fosfopiruvat-hidrataza. Nevron-specifična enolaza (NSE) je oblika enolaze, ki se nahaja v nevralnem tkivu in celicah difuzijskega neuroendokrinega sistema. NSE se nahaja v neuroendokrinih tumorjih, na primer v karcinomih malih pljučnih celic (SCLC), nevroblastomu, feokromocitomu, karcinoidu, medularnem karcinomu tireoidee, melanomih in pankreasnih endokrinih tumorjih.

Kisle fosfataze so fosfataze, ki hidrolizirajo fosfatne estre pri nižjem Ph od 7,0. Nahajajo se v lizosomih sekretornih epiteljskih celic. Čeprav je primarni nastanek kisle fosfataze v prostati, pa jo najdemo tudi v eritrocitih, trombocitih, levkocitih, kostnem mozgu, kosteh, jetrih, vranici, ledvicah in tankem črevesu.

Prostatna kislja fosfataza (PAP) ima optimalno vrednost pH-ja med 5 in 6 in je zelo labilna pri pH vrednostih nad 7, ter temperaturi nad 37 stopinj Celzija. Tartarat izrazito inhibira prostatni izoencim in tako lahko ločimo PAP od ostalih kislih fosfataz. Drugi način razlikovanja je mogoč s specifičnimi substrati za PAP. Najpogosteje uporabljena substrata sta timolftalein-monofosfat in β -naftil fosfat.

Kislja fosfataza se kot tumorski označevalec uporablja že od leta 1938, ko je bila uporabljena za skrining karcinoma prostate. Prav tako je uporabljena za oceno stadija karcinoma prostate, za prognozo in spremljanje terapije karcinoma. Povišan nivo PAP v serumu lahko kaže tudi na osteogen sarkom, multipli mielom, metastaze na kosteh in ostale karcinome. Povečana je tudi pri nekaterih benignih stanjih, na primer pri BPH, osteoporozi in hiperparatieriozi.

Do sedaj se je pri čvrstih tumorjih kislja fosfataza kot tumorski označevalec izkazala za zelo pomemben indikator. Ta encim se povečuje v serumu bolnika pri karcinomu prostate. Do povišanja pride verjetno zaradi povečane skupne količine tkiva prostate, redko pa je povišan v stopnjah O, A in začetni stopnji B. Encim se poviša za 65–92% predvsem pri bolnikih, pri katerih doseže stopnjo D (metastaze na kosteh). Lažno pozitivni rezultati so mogoči pri povišanju kisle fosfataze pri prostatitisu, benignem prostatnem tumorju in po raktalni palpaciji. Zaradi tega razloga se priporoča zelo občutljivo encimsko-imunsko dokazovanje kisle fosfataze, ki sloni na uporabi monoklonskih protiteles.

Danes je klinična uporaba PAP zamenjana s PSA, saj je PAP neobčutljiv za zgodnje odkrivanje karcinoma. Tako dandanes klinično dokazovanje PAP temelji na potrditvi karcinoma prostate in potrjevanju njegovega stadija.

Kalikreini spadajo v podskupino serin proteaz, od katerih imajo trije specifično biološko vlogo. Vsi so humani kalikreini (hK), imajo podobno gensko strukturo in se nahajajo v številnih tkivih (prostata, dojke, ovariji, testisi). Tako je na primer KLK3 (PSA) močno zastopan v prostati in manj v dojki, tireoidi, žlezi slinavki, pljučih in traheji.

Od skupno 15 kalikreinov imajo samo trije specifično biološko vlogo. Njihova vloga kot tumorskih označevalcev je zelo široka, saj so povezani hormonskimi malignomi (prostata, dojke, karcinomi testisov in ovarijev).

Prostatni-specifični antigen (PSA) je eden pomembnejših tumorskih označevalcev, kljub temu, da spada nekoliko med organo-specifične označevalce. Odkrit je bil leta 1971. Ta seminalni plazma protein so poimenovali γ -semiprotein. Leta 1979 je Wang ta isti protein izoliral iz tkiva prostate in ga poimenoval prostatni-specifični antigen. PSA se nahaja v normalnem, benignem, hiperplastičnem in malignem tkivu prostate.

PSA je serin proteaza iz kalikreinske družine, ki proizvaja izključno epitelne celice acinusa in duktusa prostate. V seminalni tekočini razgrajuje specifične proteine do proteinov nižjih molekularskih mas, ki lahko sodelujejo v procesu likvefacije in seminalne koagulacije. V krvnem obtoku obstajata dve glavni obliki PSA. Ta tvori kompleks z inhibitorji proteaze α_1 -antihemotripsinom (ACT) ali α_2 -makroglobulinom (AMG) ter manjšimi komponentami prostega PSA. Pri večini imunokemijskih metod se analizira prosti in ACT-kompleksni PSA, medtem ko se AMG-PSA ne.

PSA je zelo pomemben tumorski označevalec za odkrivanje karcinoma prostate. Uporablja se za odkrivanje stadija karcinoma in za spremljanje zdravljenja karcinoma prostate. Dokazovanje PSA je nepomembno v skriningu ali zgodnjem odkrivanju karcinoma prostate, ker je specifičen za tkivo prostate in ne za sam karcinom prostate.

Da bi povečali sposobnost PSA za zgodnje določanje, so vpeljali več izboljšav: vpeljali so referentne intervale po starostih in sicer 0 do 2,5 $\mu\text{g/L}$ za moške od 40–49 let; 0 do 3,5 $\mu\text{g/L}$ za 50–59 let; 0 do 4,5 $\mu\text{g/L}$ za 60–69 let; in 0 do 6,5 $\mu\text{g/L}$ za 70–79 let. Drugo izboljšanje je postreglo z določitvijo gostote PSA, ki se dobi z deljenjem koncentracije PSA z volumnom prostate, ki se določa s transrektalno ultrasonografijo. Tretja možnost pa obsega PSA

hitrost, ki govori o hitrosti povečevanja PSA v časovnem intervalu. Po vzpostavitvi baznega nivoja PSA se za vsakega bolnika izračuna hitrost rasti PSA. Njegova rast je različna pri zdravih ljudeh, BPH bolnikih in tistih s karcinomom prostate, kjer je rast najvišja (več kot 0,75 µg/L leto).

Danes se za dokazovanje PSA uporablja tako tradicionalne kot tudi ultrasenzitivne tehnike, ki temeljijo na imunodoločitvi z uporabo različnih snovi (encim, fluorescenca, kemiluminiscenca).

Ultraobčutljive tehnike omogočajo dokazovanje 0,01 do 0,001 µg/L, kar je mnogo manj v primerjavi s tradicionalnim PSA dokazovanjem. Najpomembnejša tehnika tega dokazovanja poteka v odkrivanju zaostalega karcinoma prostate s pomočjo radikalne prostatektomije.

Humani glandularni kalikrein 2 (hK2) in PSA (humani kalikrein 3) so serin proteaze, ki imajo 80% podobnost v proteinski sestavi in se skoraj izključno nahajajo v prostatnem epiteliju. Podobno kot PSA je tudi koncentracija hK2 100.000 krat večja v seminalni tekočini, kot v serumu. hK2 je značilen za imunohistokemijska odkrivanja stopenj karcinoma in metastaze limfnih vozlov.

Urokinaza-plazminogen aktivator sistem je sestavljen iz treh glavnih komponent; urokinaznega plazminogen aktivatorja (uPA, 53 kDa serin proteaza), uPA receptorja, vezanega na membrano (uPAR) in uPA inhibitorja PAI-1 in PAI-2. uPA se uporablja kot prognostični označevalec karcinoma dojke in številnih drugih karcinomov. Nastaja kot prost inaktivni polipeptid, ki se aktivira z vcepitvijo med lizin in izolevcin. Uporablja se kot prognostični označevalec za karcinom dojke in za številne druge karcinome.

Katepsini so lizozomalne proteaze, od katerih imajo katepsini B, D in L proučevalno vlogo v razvoju in napredku karcinoma. Katepsin B (CB) je tiol-odvisna proteaza, ki se nahaja v lizosomih, katepsin L (CL) je po specifičnosti podoben katepsinu B in je rahlo aktiven v primerjavi s substrati nižje molekulske mase. Katepsin D, podobno kot CB, je lizozomalna proteinaza, ki pripada aspartat proteinazam.

Nastajanje in lokalizacija CB se v tumorju spreminja glede na zdravo tkivo. V tumorskem tkivu se lahko veže na membrano ali se izloča. Povečano nastaja v tumorju dojke, kolonu, pljučih, prostati, gliomu, melanomih in osteoklasteh.

Matriks metaloproteinaze (MMP) ustvarja družina 23 strukturno podobnih, od cinka odvisnih endopeptidaz, ki razgrajujejo komponente ECM. MMPs so funkcionalno razdeljene v štiri podskupine, ki temeljijo na ECM specifičnosti, tako kot tudi: kolagenaze, želatinaze, stromelizini in membranske MMPs.

MMPs ustvarjajo številne funkcije, med drugim sodelujejo pri tkivni obnovi in celitvi ran. Povezane so tudi z rastjo tumorjev, invazijo in metastazami. Tako npr. MMP-2, MMP-3 in MMP-9 pospešujejo rast adenokarcinoma pljuč, ovarijev, papilarnega tieroidnega karcinoma, endometrialnega sarkoma itd. V tkivih odkrivamo MMPs s pomočjo imunohistokemijskih metod in specifičnih protiteles, v serumu in vzorcih tkiv pa z uporabo imunskega odziva.

Tumor-spremljevalni tripsin inhibitor (ang. Tumor-associated trypsin inhibitor, TATI) je bil prvič identificiran v urinu bolnika s karcinomom ovarijev. Deluje kot reaktant akutne faze in se pojavlja v izrazito vnetnih pogojih. Preprečuje avtodigestijo tkiv pod vplivom tripsinogena, ki ga izločajo pankreas in ostala tkiva.

Čeprav se nivo TATI povečuje pri pankreatitisu, je kljub temu dober tumorski označevalec za različne karcinome. V večini karcinomov se TATI povečuje zaradi povečanega nastajanja, kar povzroča vnetje in destrukcijo tkiva.

Telomeraza je sestavljena iz heksanukleotidov (TTAGGG), ki označujejo konec kromosoma in inhibirajo mehanizem popravka DNK s spajanjem koncev kromosomov. Povečana aktivnost telomeraze v tumorskih celicah predstavlja specifičen označevalec transformacije. Njena aktivnost je najdena v več kot 80% karcinomov, kjer je aktivnost v korelaciji z napredkom in napovedjo tumorja.

1.3.4 Drugi encimi

Poleg do sedaj naštetih encimov je potrebno omeniti tudi nekatere druge, kot so amilaza, lipaza, himotripsin in alanin-aminopeptidaza pri karcinomu pankreasa, glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, heksokinaza in β -glukuronidaza pri karcinomu grla in maternice, α -1,4-glukozidaza in sijalittransferaza pri karcinomu dojk in arilsulfataza B pri karcinomu debelega črevesa.

V primeru nekaterih kostnih tumorjev se povečuje alkalna fosfataza, ki prihaja iz kosti. Pri čvrstih tumorjih se najbolj povečuje število glikolitičnih izoenzimov, kot so fosfofruktokinaza, fosfohekso izomeraza, heksokinaza, aldolaza, glutation-reduktaza, laktat, malat in izocitrat dehidrogenaza itd. Uporaba teh encimov je zelo omejena, glede na to, da se povečujejo tudi v slučaju metastaz na jetrih.

Amilaza se povečuje pri 8 do 40% pacientih s karcinomom pankreasa. Potrebno je vedeti, da podobne spremembe tega encima v serumu in urinu kažejo tudi na druga obolenja, kot so pankreatitis, parotitis, intestinalna obstrukcija, renalna insuficienca ali makroamilazemija (v serumu). Do povečanja aktivnosti amilaze pride zaradi obstrukcije odvodnih kanalov pankreasa in sekundarno zaradi tumorja pankreasa.

Nasprotno čvrstim tumorjem je nespecifično povečanje glikolitičnih encimov lahko v pomoč diagnosticiranju pri metastatskih karcinomi. Podobna situacija je s holestatskimi encimi, ki so tipični za metastaze jeter. Povečanje alkalne ali kisle fosfataze pa je tipično za metastaze kosti.

Metastatske karcinome jeter spremlja: 1) holestaza, 2) nekroza jetrnih celic, 3) zmanjšanje sinteze encimov in 4) občasno povečanje glikolitičnih encimov. Metastatski karcinom jeter se odlikuje po tipičnem encimskem profilu, v katerem obstaja izrazito povečanje holestatskih encimov, zmerno povečanje aminotransferaze, zelo pogosto povečanje glutamat dehidrogenaze in zmerno zmanjšanje aktivnosti holinesteraze.

Z že omenjenimi encimi se priporoča tudi določanje fosfoheksoizomeraz in karcinoembrio antigenov (CEA), s čimer se poveča število pozitivnih rezultatov v slučaju metastaz na jetrih, vključno z »zgodnjim« odkrivanjem rasti metastatskega karcinoma.

Povečanje alkalne fosfataze in/ali kisle fosfataze se kaže na pojavu metastaz na kosteh. Alkalna fosfataza kaže na povečano aktivnost osteoblasti, kislina fosfataza pa v glavnem prihaja iz osteoklasti. Z obzirom, da se alkalna fosfataza povečuje tudi v primeru obolenja jeter, holestaze, nosečnosti ali gastrointestinalnega obolenja, je hkrati zelo pomembno določanje encimov levcin aminopeptidaze, 5'-nukleotidaze ali γ -glutamil-transpeptidaze.

Podobno kot alkalna fosfataza se tudi kislina fosfataza povečuje v primeru hiperparatireoidizma, Pagetovega obolenja, osteoporoze, osteogenesis imperfecte, Albrightovega obolenja, lipidoze in obolenja trombocitov ter eritrocitov.

Dokazovanje aktivnosti encimov ima v malignih eksudatih in tekočinah majhen pomen, glede na to, da je večina malignih eksudatov krvavih. Iz tega razloga prihaja do interferenc, zlasti v primeru glikolitičnih encimov (laktat in malat dehidrogenaza, heksokinaza in drugi), ki se nahajajo v visokih koncentracijah v eritrocitih, granulocitih in limfocitih. Tako je torej povečanje teh encimov mogoče določiti samo v tekočinah, ki niso hemoragični. Prav tako je lahko povečana aktivnost teh encimov tudi v nehemoragičnih tekočinah, za kar je lahko kriva bakterijska ali virusna infekcija. Dejstvo je, da takšen eksudat vsebuje granulocite ali limfocite, ki imajo visoko vsebnost glikolitičnih encimov. V pomoč nam je lahko analiza izoencima LDH, glede na to, da hemolizat eritrocitov vsebuje v glavnem izoencime LDH₁ in LDH₂. Razen LDH izoencima je potrebno omeniti tudi izoencim aldolaze C in tako imenovane »fetalne« aldolaze A in aldolaze C, ki se pojavljajo pri rasti nekaterih tumorjev in zlasti pri hepatomih in rabdomiosarkomih.

Histaminaza je v 70% povečana pri bolnikih z metastatskim karcinomom tiroidee, vendar se pojavlja tudi pri nekaterih drugih oblikah karcinoma (npr. ovariji, bronhiji itd.). Poleg že vseh zgoraj napisanih encimov je potrebno omeniti še nekatere druge, kot so: izoencim V 5'-nukleotid fosfodiesteraze, izoencim P diaforaze, cistinaminopeptidaza (oksitocinaza), placentalna protransglutaminaza, 17- β -hidroksisteroid dehidrogenaza, izoencim III transaminaza razvejanih aminokislin, onko-fetalni izoencim gama-glutamil-transpeptidaza in kancero-specifični izoencim amilaze. Pomembno vlogo imajo tudi glikozil in druge transferaze ogljikovih hidratov, lizocim, fosfohekso-izomeraza in terminalno deoksinukleotidil transferaza.

Lizocim (muramidaza) se je izkazal kot primeren encim za klasifikacijo levkemije. Povečane aktivnosti tega encima so najdene v serumu pri 45% bolnikih z akutno granulocitno levkemijo, pri 77% bolnikih z akutno mijelomonocitno levkemijo in 38% bolnikih z akutno limfoblastno levkemijo.

Terminalna deoksinukleotidil transferaza (TDT) se nahaja v zelo visokih koncentracijah pri normalnem timusu, T in non-T akutnem limfoblastu levkemijskih celic. Visoke aktivnosti so najdene v limfocitih periferne krvi in v kostnem mozgu pri večini bolnikov z akutno limfoblastno levkemijo.

1.4 TIMIDIN KINAZA

Timidin kinaza (TK) je encim, poimenovan tudi fosfotransferaza (kinaza), ki ga najdemo predvsem v obliki 2'-deoksitimidin kinaze in ATP-timidin 5'-fosfotransferaze v večini živih celic. Timidin kinaza katalizira reakcijo: $\text{Thd} + \text{ATP} \rightarrow \text{TMP} + \text{ADP}$ (Thd-deoksitimidin, ATP-(energijsko polna) adenzin 5'-trifosfat, TMP-deoksitimidin 5'-fosfat in ADP-adenzin 5'-trifosfat).

Timidin kinaze imajo ključno vlogo v sintezi DNA in celični delitvi, saj so del edinstvene verižne reakcije pri vcepitvi deoksitimidina v DNA. Deoksitimidin je prisoten v telesnih tekočinah kot posledica degradacije DNA iz hrane in mrtvih celic. Timidin kinaza je potrebna za delovanje različnih protivirusnih zdravil, uporablja se pri določanju hibridomskih celičnih linij za proizvodnjo monoklonskih protiteles, v klinični biokemiji pa se uporablja kot biokemijski (tumorski) marker pri nadzoru zdravljenja in spremljanja malignih bolezni, predvsem pri hematoloških malignomih ter pri odkrivanju ponovno pojavljajočih se krvnih rakih. Določanje tega encima lahko uporabljamo tudi pri odkrivanju okužbe s citomegalovirusom v zgodnji fazi.

V celicah sesalcev je prisotna timidin kinaza v dveh oblikah in sicer kot TK1 in TK2. Prva je bila najdena v fetalnem tkivu in so jo zato v začetku poimenovali fetalna TK, druge pa je bilo več v odraslih tkivih in so jo zato poimenovali odrasla TK. Kmalu so dokazali, da je TK1 prisotna v citoplazmi (citosolu) pred delitvijo celic, medtem ko se TK2 nahaja v mitohondrijih in je od celičnega ciklusa neodvisna. TK1 se sintetizira v fazi S celičnega razvoja. Po končani celični delitvi se TK1 intracelularno razgradi, tako da ne prehaja v telesne tekočine pri normalnem celičnem razvoju. Tukaj obstaja tudi povratna ureditev regulacije timidin kinaze v celici: timidin trifosfat (TTP), ki je produkt nadaljnje fosforilacije timidina, deluje kot inhibitor timidin kinaze, kar služi za uravnoteženo koncentracijo TTP fosfata pri sintezi nukleinskih kislin, tako da ne pride do prenasičenosti sistema. Tako je aktivnost TK1 najbolj izrazita v G1/S fazi celičnega cikla in ravno na podlagi tega je dokazano, da je TK1 edini proliferacijski označevalec, ki je zanesljiv in omogoča meritve v serumu (S-TK).

Timidin kinaza in hematološki malignomi: zvišana timidin kinaza priča o povečani delitvi celic. Po delitvi celic in razpoku celične membrane se ta encim sprošča v krvni obtok. Povišano timidin kinazo tako ugotavljamo pri:

- akutni mieloični levkemiji (AML) in akutni limfatični levkemiji (ALL): ugotovljena S-TK določa ponavljajoče se bolezni v zgodnji fazi, še preden je mogoča mikroskopska analiza. Obstaja tesna povezava med koncentracijo S-TK in številom levkocitov, procentom blastov v krvi, terapevtskim odzivom ter dolžino preživetja po začetno postavljeni diagnozi. Tako S-TK vrednosti označujejo agresivnost levkemičnih celic in omogočajo predvideti odziv na zdravljenje in dolžino življenja;
- ne-Hodgkinovem limfomu (NHL): številne študije so pokazale pomembnost S-TK kot prognostičnega označevalca. S-TK meritve nam omogočajo možnost nudenja primerne zdravljenja in napovedi preživetja. Tako so vrednosti S-TK višje pri dobro razvitem NHL kot pri slabo razvitem NHL. Seveda so tudi nizke stopnje S-TK dober pokazatelj za dokaz prisotnosti začetnega NHL in njegovega napredovanja. Ugotovili so tudi, da se ob primernem zdravljenju koncentracija S-TK vrne v območje normalne vrednosti, morebitna ponovno zvišana koncentracija pa lahko kaže na ponovitev bolezni ali transformacijo v več malignih oblik bolezni;
- multiplem mielomu (MM) in MGUS: izkazalo se je, da so S-TK ravni v korelaciji s kliničnimi stopnjami in časom preživetja. Poleg tega so se S-TK ravni izkazale za koristne pri razlikovanju MM in MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance) saj je bila koncentracija TK v povprečju dokazano nižja pri bolnikih z MGUS;
- Hodgkinovem limfomu: odkrite so bile značilne korelacije med S-TK stopnjami in stopnjo bolezni. S prognostično preiskavo, so glede na S-TK ravni razdelili bolnike v dve različni skupini in sicer v IA in IIA, glede na preživetje brez bolezni. Ta ugotovitev je naredila S-TK zanimivo kot dodatno orodje v kliničnih ocenah in terapevtskih odločitvah pri bolnikih s Hodgkinovo boleznijo;
- kronični limfocitni levkemiji (CLL): sedanji obstoječi modeli v KLL, kot sta Binet in Rai klasifikaciji, ne morejo natančno napovedati tveganja za napredovanje bolezni. Tako so s S-TK dokazali, da ima izredno prognostično zmogljivost. Bolniki, ki imajo serumsko raven preko 7,1 U/L imajo povprečni čas preživetja brez napredovane bolezni približno 8 mesecev, medtem ko imajo

bolniki z nižjo koncentracijo (manj kot 7,1 U/L) povprečni čas preživetja brez napredovanja bolezni v povprečju 49 mesecev, kar je podobno pacientom z začetno stopnjo CLL.

- mielodisplastičnem limfomu (MDS): visoka S-TK in MDS napovedujeta transformacijo MDS v AML. Številne analize so potrdile neodvisno prognostično vrednost S-TK pri določanju rizičnosti za akutno transformacijo in preživetje po njej. Na podlagi tega lahko sklepamo, da je S-TK pomemben prognostični dejavnik pri določanju MDS in je hkrati močno povezan z razvojem AML.

S-TK se je tako izkazala za zanesljivega označevalca tumorskih celic in tako zagotavlja učinkovito prognozo pri nezdravljenih hematoloških malignih obolenjih. Njena učinkovitost se kaže prav tako pri spremljanju samih obolenj, pri remisijah ter detekciji prikritih znakov bolezni. S pomočjo S-TK lahko zanesljivo določimo relaps določene bolezni in to nekaj mesecev pred pojavom kliničnih simptomov.

1.5 β -2-MIKROGLOBULIN

Beta-2-mikroglobulin je protein, ki je prisoten na celični membrani skoraj vseh diferenciranih celic in je identičen lahki verigi HLA. Zasledimo v vseh telesnih tekočinah kot prostega ali vezanega na verige HLA, vendar v zelo nizkih koncentracijah (serumske koncentracije znašajo od 1,2 – 2,5 ng/ml).

Beta-2-mikroglobulin leži bočno na $\alpha 3$ verigo na površini celice. Za razliko od $\alpha 3 \beta 2$ nima transmembranskih regij. Neposredno nad $\beta 2$ leži $\alpha 1$ veriga (stran od površine celice), bočno na $\alpha 1$ pa leži $\alpha 2$. Beta-2-mikroglobulin ne sodeluje samo z alfa verigo MHC razreda I, ampak tudi z drugimi molekulami razreda I, kot sta CD1 in Qa.

S pomočjo genskega inženiringa na miših so ugotovili, da je beta-2-mikroglobulin potreben za izražanje molekul MHC razreda I na površini celic in stabilnost ter povezovanje peptidov v skupine. V njegovi odsotnosti je tako mogoče zaznati zelo omejene količine molekul MHC razreda I. Posledično se tako ne morejo razviti limfociti T razreda CD8, kar je zelo pomembno pri razvoju imunskega sistema.

Kot smo že rekli, je beta-2-mikroglobulin prisoten na celični površini predvsem pri belih krvnih celicah. Za povečano količino serumske koncentracije beta-2-mikroglobulina v krvi

je lahko vzrok povečana sinteza samega proteina zaradi hitrejše delitve celic, hitrega razpada celičnih membran in odmiranja celic ter močnejše delovanje imunskega sistema, kakor tudi zmanjšana filtracijska kapaciteta ledvic (98 odstotkov se ga izloča preko ledvic). Takšno povečanje lahko opazimo tudi pri osebah z rakom belih krvnih celic, kar je še posebej pomembno pri ljudeh, ki imajo na novo diagnosticiran multipli mielom (MM). Zato je določitev stopenj beta-2-mikroglobulina zelo pomembna za prognozo, odraz trenutnega stanja, potek bolezni in kvaliteto zdravljenja. Povišana raven je lahko tudi pri nekaterih okužbah z virusi, vključno s citomegalovirusom in HIV virusom. Študije so pokazale, da z napredkom okužbe HIV narašča tudi raven beta-2- mikroglobulina.

Za serumske koncentracije beta 2-mikroglobulina je znano, da odražajo delovanje ledvic in so hkrati dober pokazatelj prometa B2M skozi membrane, kar nam omogoča postaviti vzporednice s tumorsko maso in stopnjo rasti. Povišane serumske koncentracije so tako prisotne pri hematoloških malignih boleznih, kot so MM, nizka stopnja limfoma, velika limfoma celic, Hodgkinov limfom, ALL, KML, KLL, mielodisplastični sindrom, pri bolnikih z rakom dojk, pljuč, trebušne slinavke, širokega črevesa, danke itd.

Mednarodni sistem razvrščanja bolnikov DP (desiminiranega plazmocitoma) po stopnjah (mednarodni prognostični indeks)

Tabela 9: Mednarodni sistem razvrščanja bolnikov DP po stopnjah

Stadij	Kriterij	Preživetje
1	B2M<3,5 mg/L in albumin 35g/L	62 mesecev
2	B2M<3,5 mg/L in albumin <35 ali B2M 3,5-5,5 mg/L	44 mesecev
3	B2M	29 mesecev

- multipli mielom (MM): serumski beta 2-mikroglobulin je bil predlagan kot najmočnejši prognostični dejavnik pri multiplem mielomu, zato je bila raziskana

sposobnost odkrivanja remisij in relapsov. Tako je bila opravljena korelacija analize med določljivostjo beta 2M in M-komponente pri diagnozah in mesečno pri 21 sledečih bolnikih z MM in normalno renalno funkcijo. Statistično značilna korelacija je bila opažena pri samo 52,4 % pacientov. Pomanjkanje korelacije pri ostalih primerih je bila posledica prenizkih koncentracij beta 2M ali neodvisne povezave teh dveh parametrov. Serumski beta 2M se je tako izkazal za precej manj zanesljiv parameter za ugotavljanje tumorskih sprememb od enostavnejših M-komponent.

V povezavi MM in MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance) se je izkazalo, da so B2MG ravni v korelaciji s kliničnimi stopnjami in časom preživetja. Poleg tega so se B2MG ravni izkazale za koristne pri razlikovanju MM in MGUS, saj je bila koncentracija B2MG v povprečju dokazano nižja pri bolnikih z MGUS kot pri bolnikih z MM.

- ne-hodkinov limfom (NHL): beta 2M test je uporaben le pri nekaterih bolnikih z NHL. Iz dosedanjih rezultatov je razvidno, da lahko napovedujejo ponovitve za stopnjo I in II Hodgkinovih bolezni na podlagi spola, prisotnosti mediastinalnih bolezni, povišanih koncentracij beta 2M in po vsej verjetnosti tudi hipoalbuminemije. To lahko omogoča intenzivnejše zdravljenje manjše skupine pacientov z višjo verjetnostjo relapsa.
- akutna mieloična levkemija (AML): pri bolnikih z AML je povišana koncentracija beta 2M zelo močan, predvidljiv indikator, predvsem pri tistih, ki so starejši od 60 let in imajo na novo diagnosticirano AML. Uveden sistem točkovanja, ki vključuje vse prognostične dejavnike, se je izkazal za specifično pomembnega (citogeneza, splošno stanje, beta 2M, sečna kislina, LDH ravni) in predstavlja prednost pri opredelitvi bolnikov z ugodno ali neugodno prognozo ter prilagajanju terapevtskih pristopov.
- kronična limfatična levkemija (CLL): beta-2M se je izkazal kot prognostično pomemben označevalec pri limfomih, MM in je v korelaciji z CLL. Zvišana koncentracija beta-2M je neodvisen napovedovalec preživetja brez napredovanja bolezni (PFS - progression free survival) pri zdravljenih in nezdravljenih bolnikih. Zvišane koncentracije beta-2M je moč opaziti tudi pri bolnikih z visoko razvitimi

tumorji in obsežnih infiltracijah kostnega mozga. Poleg napredovanja bolezni sta tako oba beta-2M8-10 in TKA 11 povezana s kratko trajajočo remisijo in slabšim preživetjem po zdravljenju.

- mielodisplastični sindrom (MDS): analize plazemske koncentracije beta-2M pri bolnikih z mielodisplastičnim sindromom so pokazale, da je beta-2M neodvisna prognostična spremenljivka preživetja, pri tem pa je odločilnega pomena tudi določitev kariotipa. Vključitev beta-2M pri MDS bolnikih je omogočila s pomočjo IPSS razvrstiti bolnike v rizične skupine. Rezultati analiz so tako dokazali, da hkrati določitev beta-2M in kariotipa omogočata najnatančnejšo napoved preživetja, vendar pa je kljub temu priporočljiva rutinska analiza beta-2M pri bolnikih z MDS.

2 Namen dela

Namen eksperimentalnega dela je ugotoviti, koliko so povišane koncentracije serumskega beta 2 mikroglobulina in timidin kinaze pri različnih hematoloških obolenjih, kot so mielodisplastični sindrom (MDS), kronična limfatična levkemija (CLL), akutna mieloična in limfatična levkemija (AML in ALL), multipli mielom (MM) in non-Hodgkinov limfom (NHL). Zanima nas predvsem, kakšna je njuna koncentracija glede na stanje pacientov in kakšen je klinični pomen, ko gre za remisijo ali za relaps, hkrati pa želimo ugotoviti, ali poteka med njima korelacijska odvisnost, saj bi nam to dejstvo lahko omogočilo lažje diagnosticiranje bolezni, njeno napoved, določanje stadija in razširitev bolezni.

3 Eksperimentalni del

V času od februarja pa do junija 2008 smo na oddelku hematologije na Polikliniki v Ljubljani izvajali meritve TK, B2MG in LDH-ja. Meritve smo izvedli na podlagi predhodno postavljene diagnoze za določene bolezni, kot so mielom, NHL, MGUS, AML, ALL in tako določili, ali gre za stabilno stanje bolezni pri pacientih ali za stanje, kjer je bolezen ponovno izbruhnila.

Bolnikom smo odvzeli vzorce krvi, epruvete ustrezno označili in jih centrifugirali 10 min na 3500 rpm pri sobni temperaturi. Tako pripravljeni vzorci so bili pripravljeni za analizo.

Pri NHL smo obravnavali 72 osebkov, moških je bilo 46 (64%) in žensk 26 (36%), povprečna starost preiskovancev je bila 69,9 let. Pri MIELOMU smo skupno obravnavali 59 osebkov, moških je bilo 35 (59 %) in žensk 24 (41%), povprečna starost preiskovancev je bila 62,8 let. Pri MGUS-U smo skupno obravnavali 7 osebkov, moških je bilo 5 (71 %) in 2 ženski (29 %), povprečna starost preiskovancev je bila 62,3 let. Pri AML smo skupno analizirali 40 osebkov, moških je bilo 22 (55 %) in žensk 18 (45 %), povprečna starost preiskovancev je bila 55,7 let in pri ALL smo skupno analizirali 16 vzorcev, moških je bilo 11 (69 %) in žensk 5 (31 %), povprečna starost preiskovancev pa je bila 37,4 let.

Tako smo v remisiji (stabilno stanje) analizirali 60 vzorcev za NHL, 59 vzorcev za mielom, 36 za AML in 15 za ALL, v relapsu (ponovitev bolezni) pa 12 za NHL, 7 za MGUS, 4 za AML in 1 za ALL.

3.1 TIMIDIN KINAZA

3.1.1 Princip metode

Koncentracijo timidin kinaze smo določili na DiaSorin LIAISON[®] analizatorju, uporabili smo LIAISON[®] Thymidine kinase reagente.

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

V prvi stopnji encimske reakcije timidin kinaza v vzorcu pripomore k temu da se AZT (3`-azido – 3` deoksitimidin) pretvori v AZTMP (3`-azido-3` deoksitimidin mono fosfat). Količina AZT, ki se pretvori v AZTMP je merjena količina timidin kinaze, ki je v vzorcu. 50µL vzorca inkubiramo z 100µL pufra 1, 20µL pufra 2 in 20µL poliklonskih protiteles anti-AZTMP, ki so prevlečena z magnetnimi delci. Po 40-minutni inkubaciji dodamo 100µL označevalca in AZTMP, to je dodani analogni konjugat. Med prvo inkubacijo se AZTMP veže na trdni nosilec. Po drugi inkubaciji označevalec tekmuje za vezavno mesto na AZTMP v raztopini. Po 20-minutni inkubaciji se nevezan material spere s ciklom spiranja. Ob dodatku startnega reagenta poteče reakcija kemiluminescence. Sprosti se svetloba, ki se meri z luminometrom v relativnih svetlobnih enotah (Relative Light Units-RLU) in je premo sorazmerna koncentraciji timidin kinaze (19).

3.1.2 Materiali

Tabela 10: Reagenti za določanje TK

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

Tabela 11: Kalibratorji za določanje TK

Kalibrator 1 (liofiliziran)	Človeški serum, 0,09% NaN ₃ in TK rekonstruira v 1mL destilirane ali deionizirane vode.
Kalibrator 2 (liofiliziran)	Človeški serum, 0,09% NaN ₃ in TK rekonstruira v 1mL destilirane ali deionizirane vode.

3.1.3. Postopek testa

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

Operacije analizatorja so naslednje:

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

3.1.4. Kalibracija aparature

Kalibracijo izvajamo:

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

Meritveno območje

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

3.1.5 Opis metode

Merjenje temelji na principu kemiluminiscence:

kemiluminiscenca je emisija svetlobe, ki se sprosti ob kemijski reakciji pri normalni temperaturi. Kemiluminiscenčne metode so kompetitivne, pri njih je antigen zaznamovan z

luminolom. Pri imunokemični reakciji antigena s protitelesi dodamo reagent, ki vsebuje vodikov peroksid (H_2O_2) in encim peroksidazo. Z dodajanjem peroksidaze spravimo luminol v vzbujeno stanje. Peroksidaza H_2O_2 pretvori v H_2O in povzroči oksidacijo luminola. Prek intermediatorjev prehaja luminol v osnovno stanje, sprostijo se fotoni in oddaja se luminiscenca. V reakciji se sprošča svetlobna energija, ki jo merimo pri 425nm (13).

3.1.6 Kontrola kakovosti

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

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

3.2 β -2-MIKROGLOBULIN

Koncentracijo β 2-mikroglobulina smo določali v serumu. Analiza se je izvajala na LIAISON[®] analizatorju z LIAISON[®] β 2- microglobulin reagenti.

3.2.1 Princip metode

Metoda za kvantitativno določanje β 2-mikroglobulina temelji na kemiluminescenci. Poliklonalna protitelesa (kunjca) se vežejo na trden nosilec (magnetni delci). Med inkubacijo se B2MG odcepi od vezavne beljakovine in tekmuje za vezavno mesto na protitelesu, označenim z B2MG. Po inkubaciji se nevezan material odstrani s spiranjem. Pozneje od dodatku začetnega reagenta poteče reakcija, pri kateri nastane konjugat izoluminol-protitelo, sprosti se svetloba, ki se izmeri z luminometrom v relativnih svetlobnih enotah (Relative Light Units- RLU) (18).

3.2.2 Materiali

Tabela 12: Reagenti za določanje B2MG

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

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

3.2.3 Princip testa

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

Operacije analizatorja so naslednje:

Tabela 13: Operacije analizatorja za B2MG

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

3.2.4 Opis metode

Merjenje temelji na principu kemiluminiscence:

Kemiluminiscenca je emisija svetlobe, ki se sprosti ob kemijski reakciji pri normalni temperaturi. Kemiluminiscenčne metode so kompetetivne, pri njih je antigen zaznamovan z luminolom. Pri imunokemični reakciji antigena s protitelesi dodamo reagent, ki vsebuje vodikov peroksid (H_2O_2) in encim peroksidazo. Z dodajanjem peroksidaze spravimo

luminol v vzbujeno stanje. Peroksidaza H_2O_2 pretvori v H_2O in povzroči oksidacijo luminola. Prek intermediatorjev prehaja luminol v osnovno stanje, sprostijo se fotoni in oddaja se luminiscenca. V reakciji se sprošča svetlobna energija, ki jo merimo pri 425nm (13).

3.2.5 Kalibracija aparature

Kalibracijo izvajamo:

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

Meritveno območje

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

3.2.6 Kontrola kakovosti

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

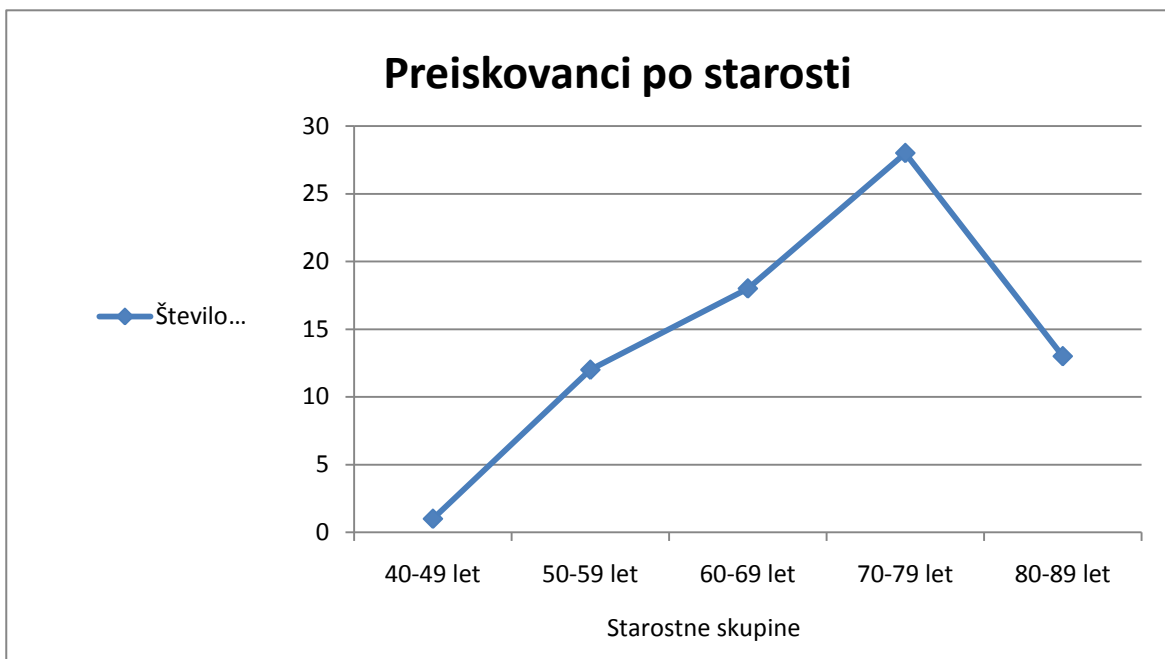
Kadar je kontrola izven zahtevanega območja, je ponovno potrebno izvesti kalibracijo in kontrolni test (13).

Statistična analiza je bila izvedena s pomočjo programa MedCalc ver. 11.2.1.0, kjer smo določili korelacijski koeficient r in signifikacijsko stopnjo P pri 95% intervalu zaupanja za r . Pri testu smo postavili stopnjo tveganja α na 0.05 in ugotavljali ali med spremenljivkama poteka linearna odvisnost ali ne.

4 Rezultati

4.1 Vzorci

Pri NHL smo skupno analizirali 72 vzorcev, moških je bilo 46 (64%) in žensk 26 (36%). Povprečna starost preiskovancev je bila 70 let, najmlajši je imel 48 let, najstarejši pa 89 let.

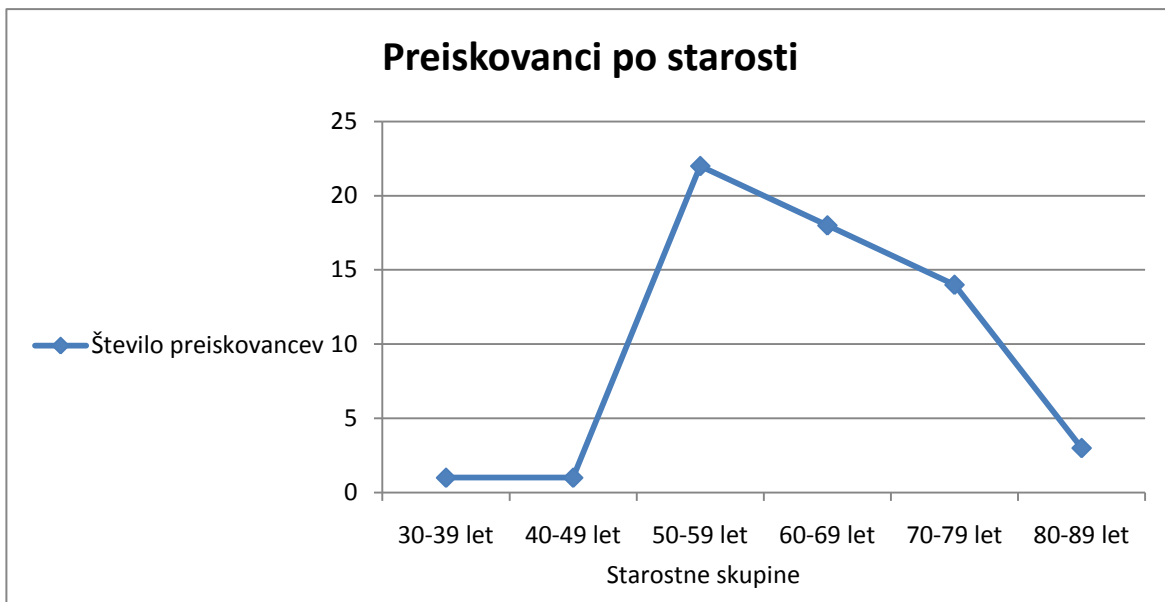


Graf 1: Število preiskovancev po starosti za NHL

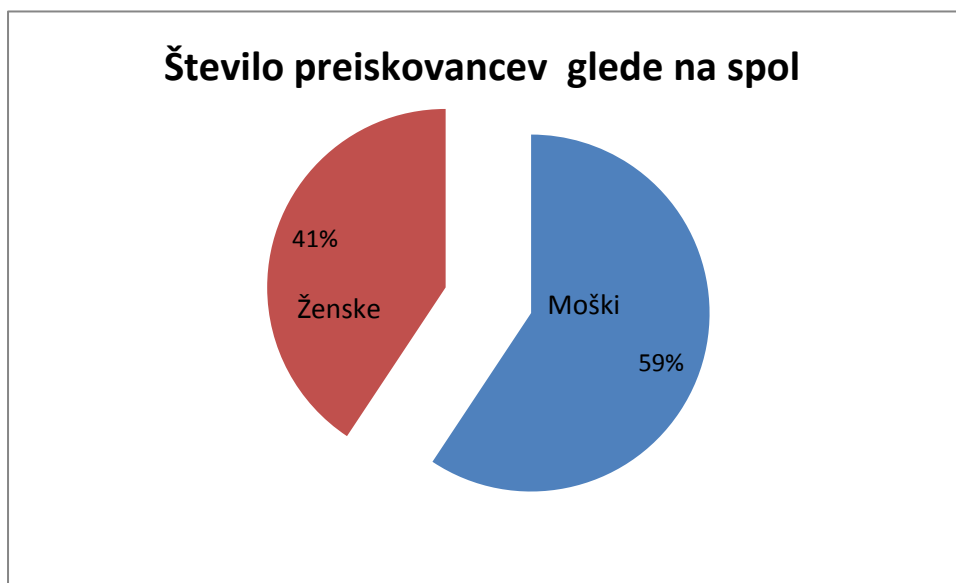


Graf 2: Število preiskovancev glede na spol za NHL

Pri MIELOMU smo skupno analizirali 59 vzorcev, moških je bilo 35 (59 %) in žensk 24 (41%). Povprečna starost preiskovancev je bila 62,8 let, najmlajši je imel 37 let, najstarejši pa 83 let.

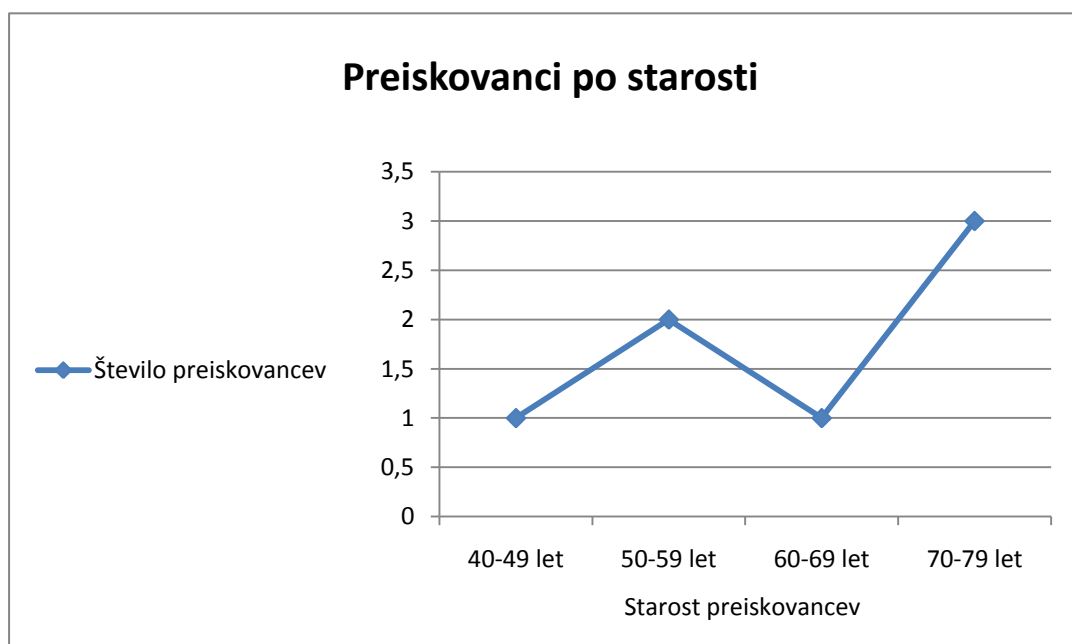


Graf 3: Število preiskovancev po starosti za Mielom



Graf 4: Število preiskovancev glede na spol za Mielom

Pri MGUS-U smo skupno analizirali 7 vzorcev, moških je bilo 5 (71 %) in 2 ženska (29 %). Povprečna starost preiskovancev je bila 62,3 let, najmlajši je imel 49 let, najstarejši pa 74 let.

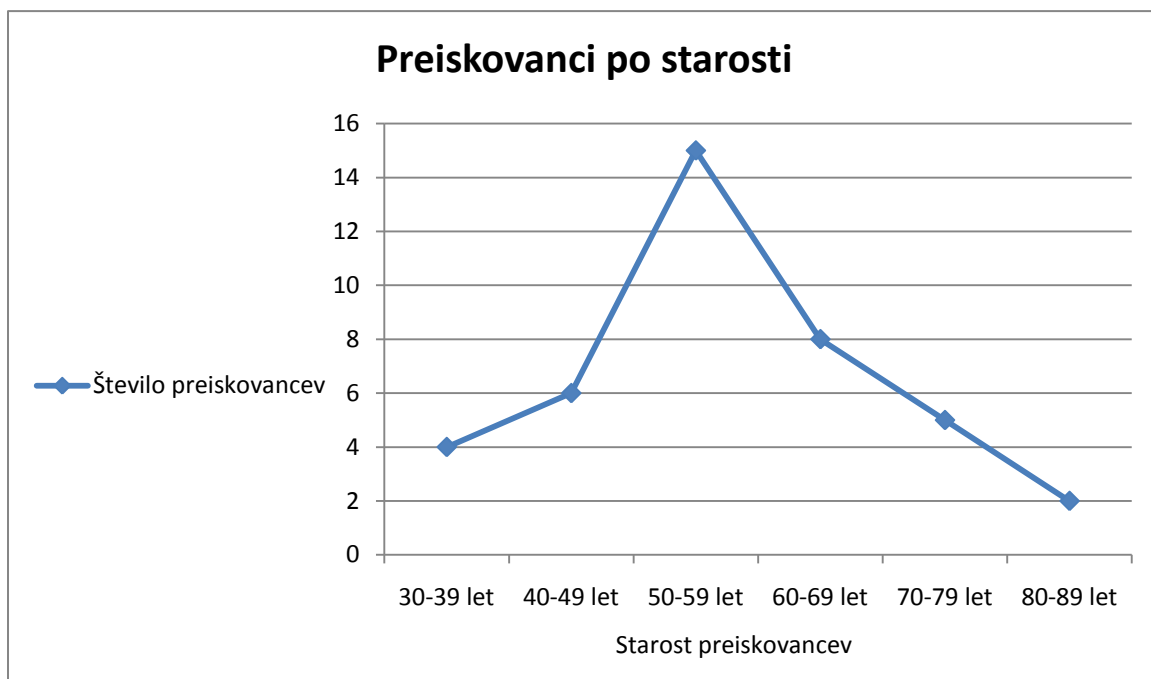


Graf 5: Število preiskovancev po starosti za MGUS



Graf 6: Število preiskovancev glede na spol za MGUS

Pri AML smo skupno analizirali 40 vzorcev, moških je bilo 22 (55 %) in ženskih 18 (45 %). Povprečna starost preiskovancev je bila 55,7 let, najmlajši je imel 31 let, najstarejša pa 81 let.

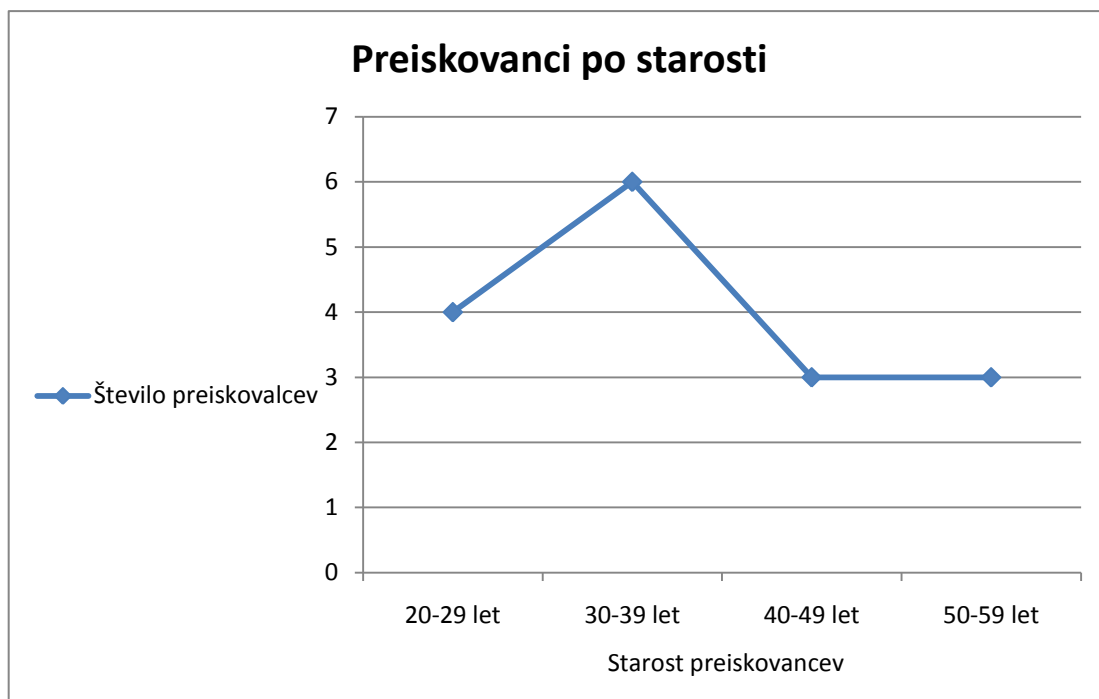


Graf 7: Število preiskovancev po starosti za AML

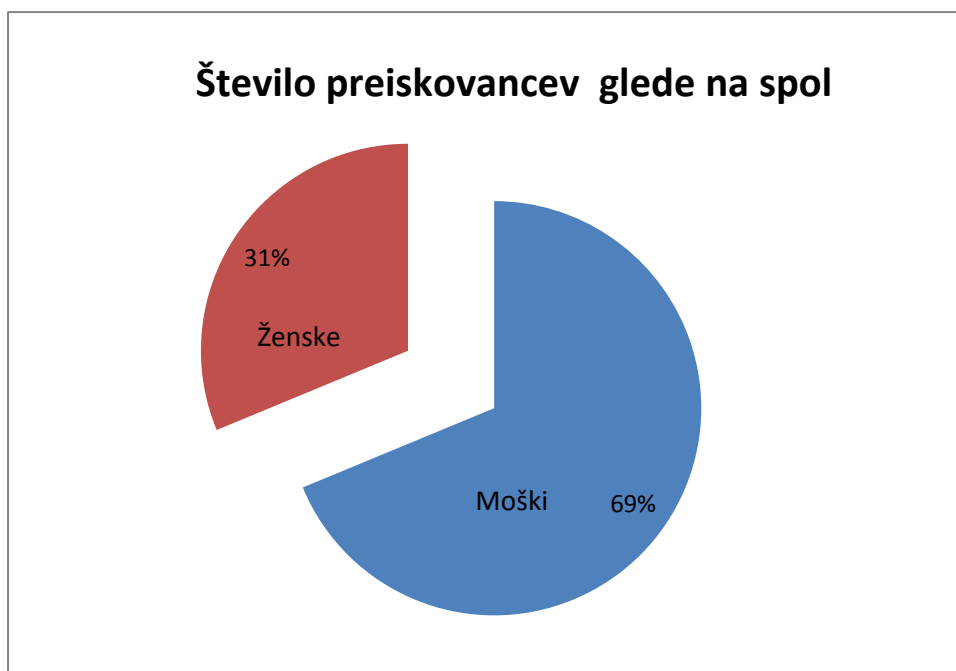


Graf 8: Število preiskovancev glede na spol za AML

Pri ALL smo skupno analizirali 16 vzorcev, moških je bilo 11 (69 %) in žensk 5 (31 %). Povprečna starost preiskovancev je bila 37,4 let, najmlajši je imel 21 let, najstarejši pa 54 let.



Graf 9: Število preiskovancev po starosti za ALL



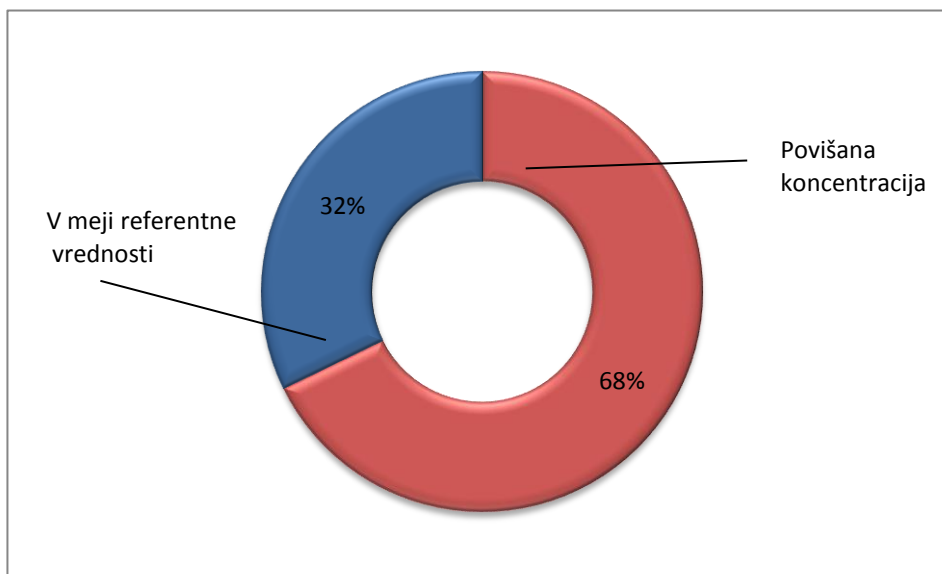
Graf 10: Število preiskovancev glede na spol za ALL

4.2 Remisija

4.2.1 Rezultati določanja koncentracije timidin kinaze

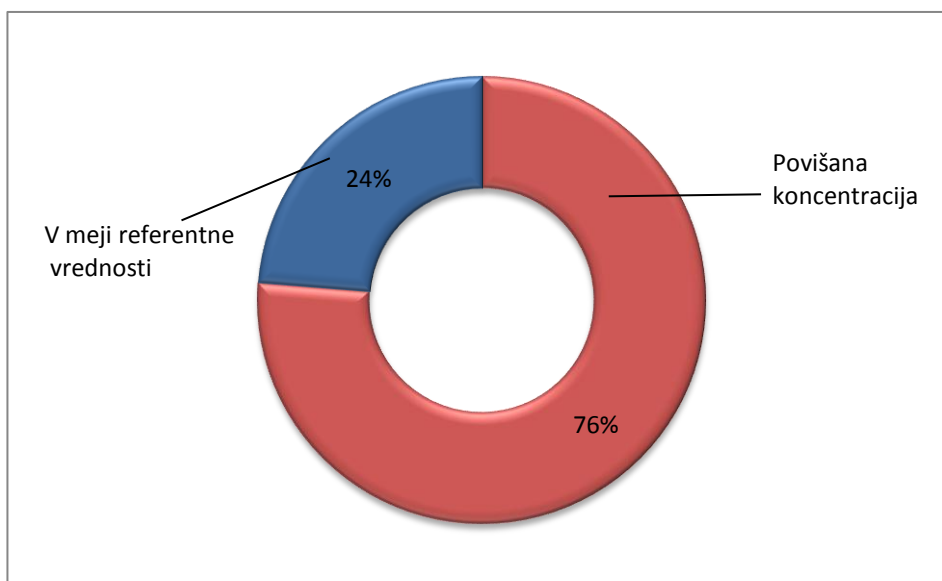
Referenčna vrednost za koncentracijo timidin kinaze v serumu znaša do 6,1E/L.

Pri NHL smo analizirali v remisiji 60 vzorcev, za en vzorec nam ni uspelo dobiti meritve, od ostalih 59 je imelo povišano koncentracijo 40 vzorcev (68 %), v območju referenčnih vrednosti pa jih je bilo 19 (32 %).



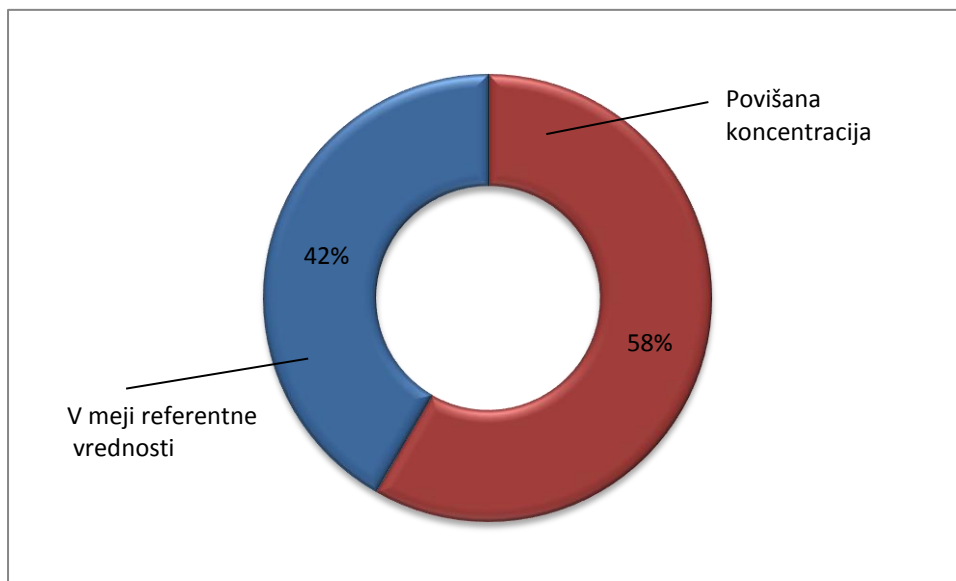
Graf 11: Rezultati koncentracij TK v remisiji za NHL

Pri Mielomu smo analizirali v remisiji 59 vzorcev, kjer jih je bilo povišanih 45 (76 %) in v mejah referenčnih vrednosti 14 (24 %).



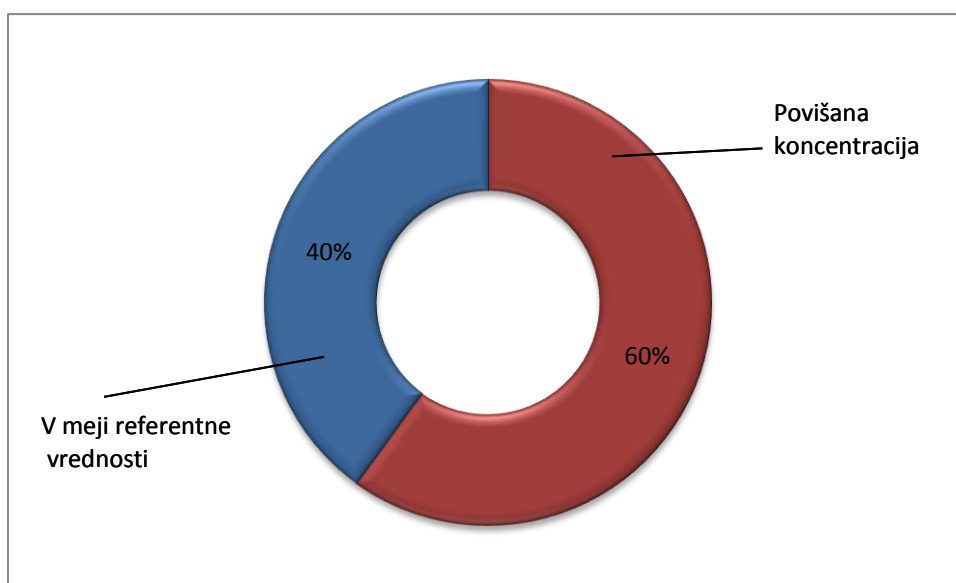
Graf 12: Rezultati koncentracij TK v remisiji za Mielom

Pri AML smo analizirali v remisiji 36 vzorcev, kjer jih je bilo povišanih 21 (58 %) in v mejah referenčnih vrednosti 15 (42 %).



Graf 13: Rezultati koncentracij TK v remisiji za AML

Pri ALL smo analizirali v remisiji 15 vzorcev, kjer jih je bilo povišanih 9 (60 %) in v mejah referenčnih vrednosti 6 (40 %).



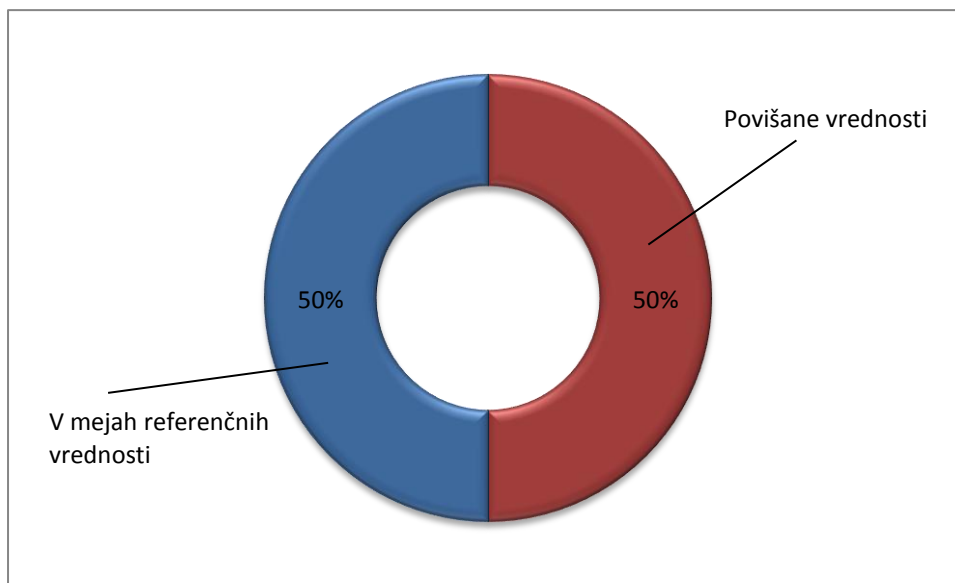
Graf 14: Rezultati koncentracij TK v remisiji za ALL

4.2.2 Rezultati določanja koncentracije β -2 mikroglobulina

Referenčne vrednosti za koncentracijo β -2 mikroglobulina v serumu znašajo:

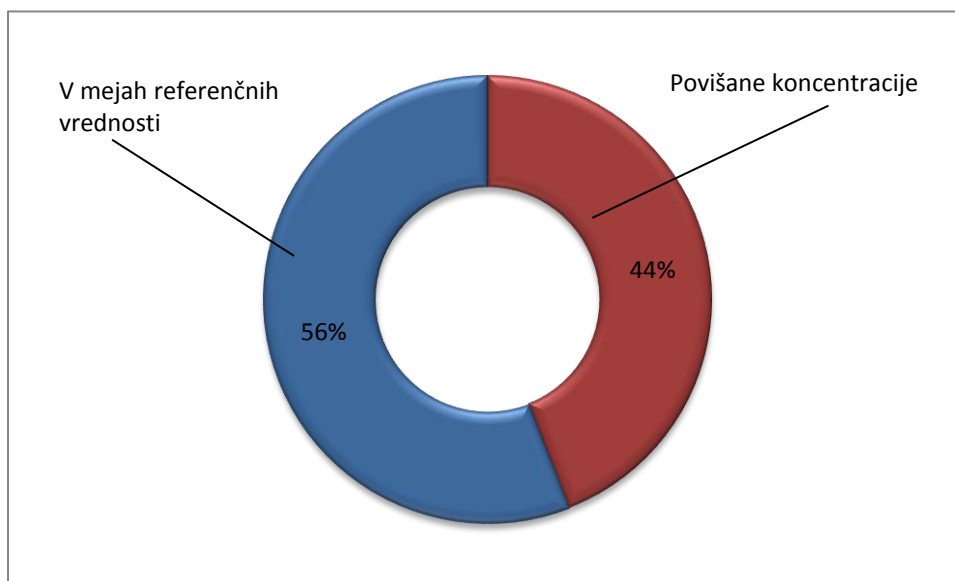
- za moške: 0,60-2,29 mg/L
- za ženske: 0,61-2,45 mg/L

Izmerjeni rezultati za B2MG pri NHL v remisiji kažejo, da jih je od 60 vzorcev 30 (50 %) v referenčnem območju in ravno toliko v povišani koncentraciji.



Graf 15: Rezultati koncentracij B2MG v remisiji za NHL

Izmerjeni rezultati za B2MG pri mielomu v remisiji kažejo, da jih je od 59 vzorcev 33 (56 %) v referenčnem območju in 26 (44 %) zunaj referenčnega območja.

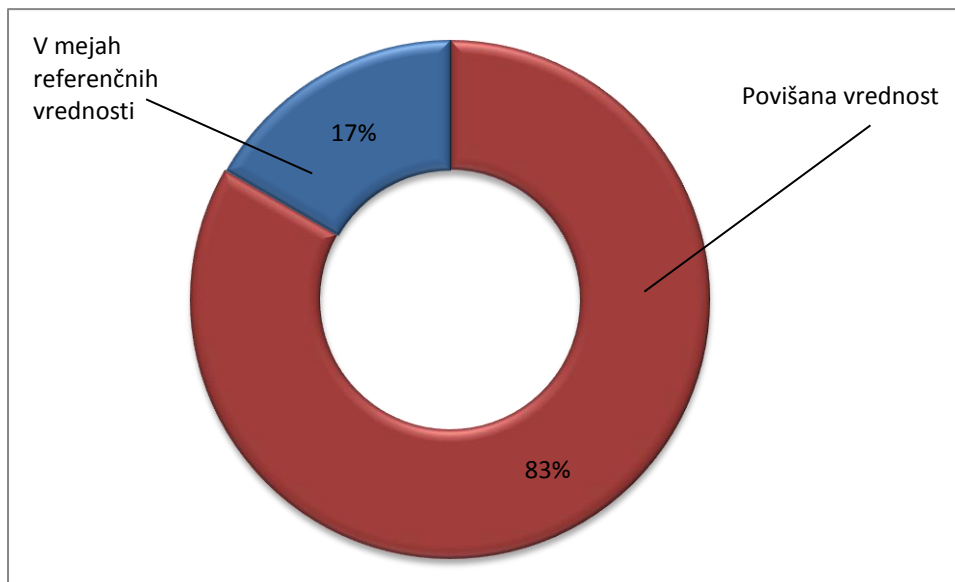


Graf 16: Rezultati koncentracij B2MG v remisiji za Mielom

4.3 Relaps

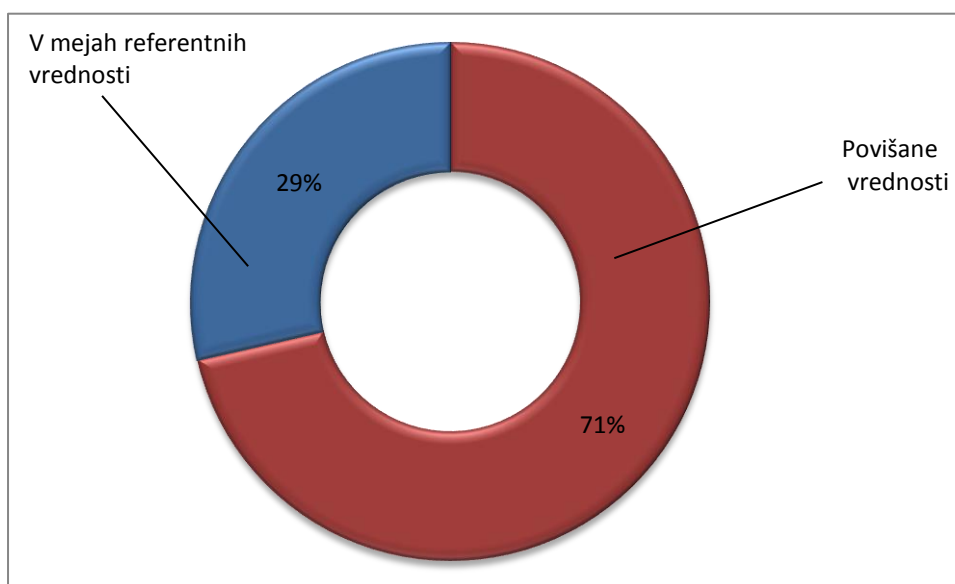
4.3.1. Rezultati določanja koncentracije timidin kinaze

Pri NHL smo analizirali v relapsu 12 vzorcev, povišano koncentracijo je imelo 10 vzorcev (83 %), v območju referenčnih vrednosti pa sta bila 2 (17 %).



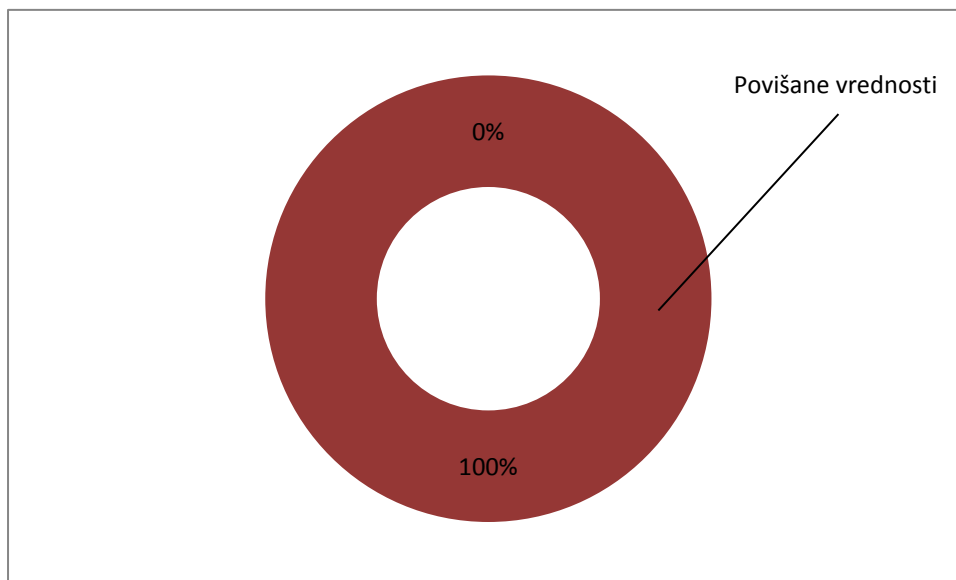
Graf 17: Rezultati koncentracij TK v relapsu za NHL

Pri MGUS-u smo analizirali v relapsu 7 vzorcev, povišano koncentracijo je imelo 5 vzorcev (71 %), v območju referenčnih vrednosti pa sta bila 2 (29 %).



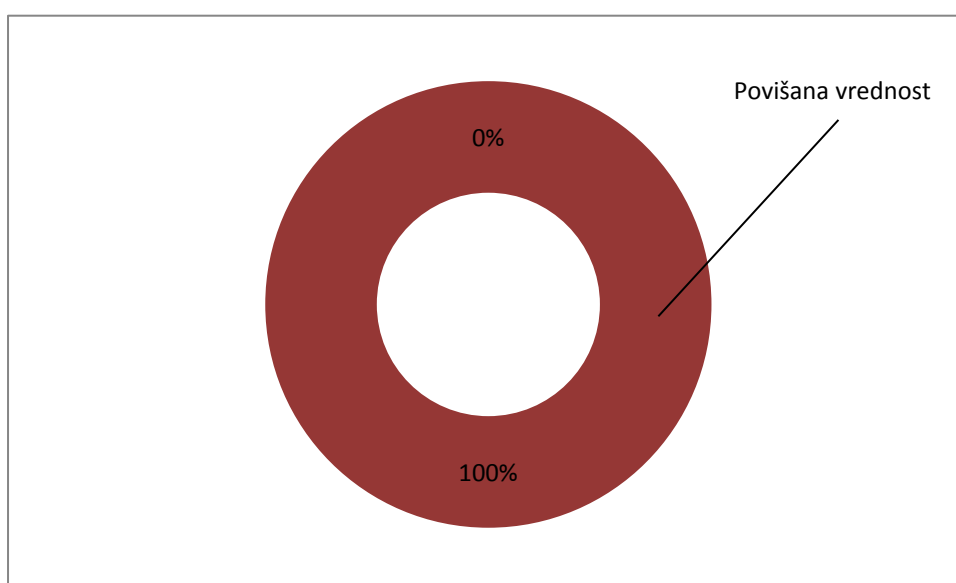
Graf 18: Rezultati koncentracij TK v relapsu za MGUS

Pri AML smo analizirali v relapsu 4 vzorce, povišano koncentracijo so imeli vsi vzorci, v območju referenčnih vrednosti pa tako ni bilo nobenega.



Graf 19: Rezultati koncentracij TK v relapsu za AML

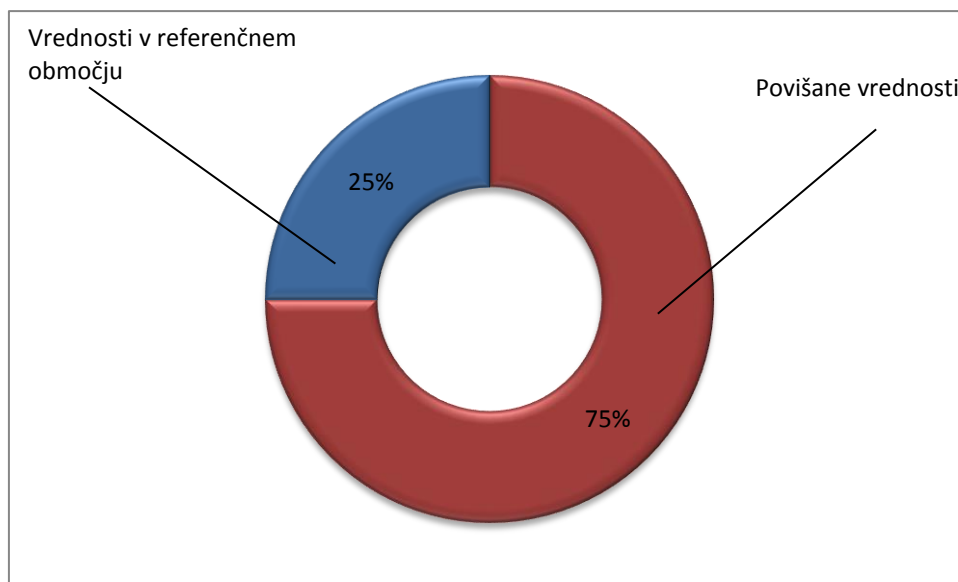
Pri ALL smo analizirali v relapsu 1 vzorec, ki je bil tudi povišan (100 %).



Graf 20: Rezultati koncentracij TK v relapsu za ALL

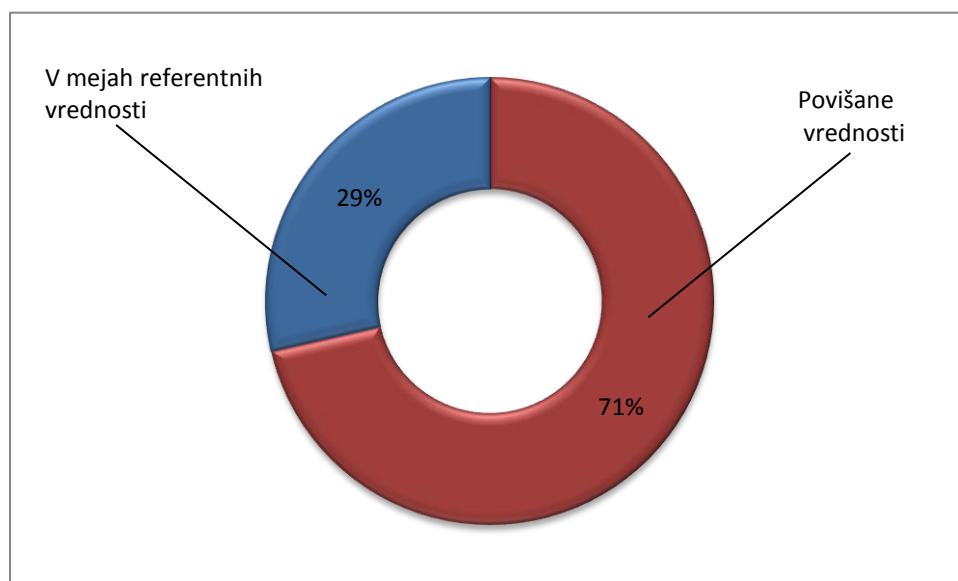
4.3.2 Rezultati določanja koncentracije β -2 mikroglobulina

Pri NHL smo analizirali v relapsu 12 vzorcev, povišano koncentracijo je imelo 9 vzorcev (75 %), v območju referenčnih vrednosti pa so bili 3 (25 %).



Graf 21: Rezultati koncentracij B2MG v relapsu za NHL

Pri MGUS-u smo analizirali v relapsu 7 vzorcev, povišano koncentracijo je imelo 5 vzorcev (71 %), v območju referenčnih vrednosti pa so bili 3 (29 %).



Graf 22: Rezultati koncentracij B2MG v relapsu za MGUS

Tabela 14: Število vzorcev, povprečna vrednost in standardna deviacija vzorcev v remisiji

NHL			
	TK	β-2-MG	
		moški	ženske
N	60	38	22
M	20,50	2,86	2,63
SD	26,28	1,47	1,61
MIELOM			
	TK	β-2-MG	
		moški	ženske
N	59	35	24
M	16,55	2,62	4,60
SD	20,59	1,55	7,65
MGUS			
	TK	β-2-MG	
		moški	ženske
N	/	/	/
M	/	/	/
SD	/	/	/
AML			
	TK	β-2-MG	
		moški	ženske
N	36	/	/
M	19,74	/	/
SD	30,00	/	/
ALL			
	TK	β-2-MG	
		moški	ženske
N	15	/	/
M	14,00	/	/
SD	15,41	/	/

Tabela 15: Število vzorcev, povprečna vrednost in standardna deviacija vzorcev v relapsu

NHL			
	TK	β-2-MG	
		moški	ženske
N	12	8	4
M	26,74	3,42	3,28
SD	33,56	1,56	0,21
MIELOM			
	TK	β-2-MG	
		moški	ženske
N	/	/	/
M	/	/	/
SD	/	/	/
MGUS			
	TK	β-2-MG	
		moški	ženske
N	7	5	2
M	35,76	6,39	2,16
SD	43,84	7,27	0,99
AML			
	TK	β-2-MG	
		moški	ženske
N	4	/	/
M	62,27	/	/
SD	30,88	/	/
ALL			
	TK	β-2-MG	
		moški	ženske
N	1	/	/
M	50,6	/	/
SD	/	/	/

Tabela 16: Primerjave povprečnih vrednosti pri posameznih diagnozah in % povišanih vrednosti v primerjavi z referenčno vrednostjo

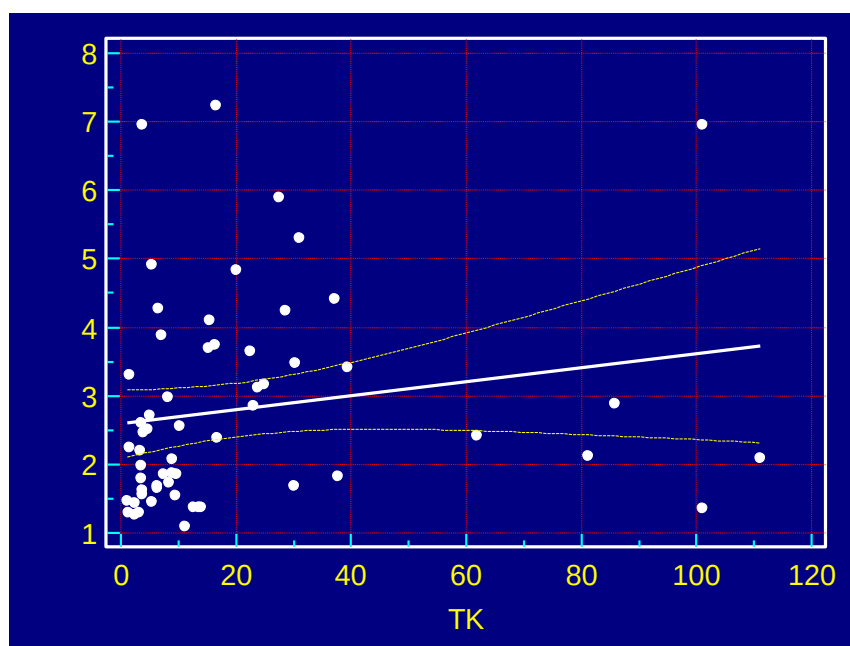
M ; % povišanih	NHL			
	TK		β-2-MG	
	remisija	relaps	remisija	relaps
	20,56 ; 67,79%	26,74 ; 83,33%	2,78 ; 50,00%	3,38 ; 75,00%
M ; % povišanih	MIELOM			
	TK		β-2-MG	
	remisija	relaps	remisija	relaps
	16,55 ; 76,27%	/	3,43 ; 44,06%	/
M ; % povišanih	MGUS			
	TK		β-2-MG	
	remisija	relaps	remisija	relaps
	/	35,76 ; 71,42%	/	5,18 ; 71,42%
M ; % povišanih	AML			
	TK		β-2-MG	
	remisija	relaps	remisija	relaps
	19,74 ; 58,33%	62,27; 100%	/	/
M ; % povišanih	ALL			
	TK		β-2-MG	
	remisija	relaps	remisija	relaps
	14,00 ; 60,00%	50,6 ; 100%	/	/

4.3.3 Izračuni korelacij v remisiji

Izračun korelacije za NHL:

Spremenljivka Y	B2MG
Spremenljivka X	TK

Število vzorcev	59
Korelacijski koeficient r	0,1790
Signifikacijska stopnja	P=0,1749 P>0,05; statistično neznačilna povezava
95% interval zaupanja za r	-0,08077 do 0,4160

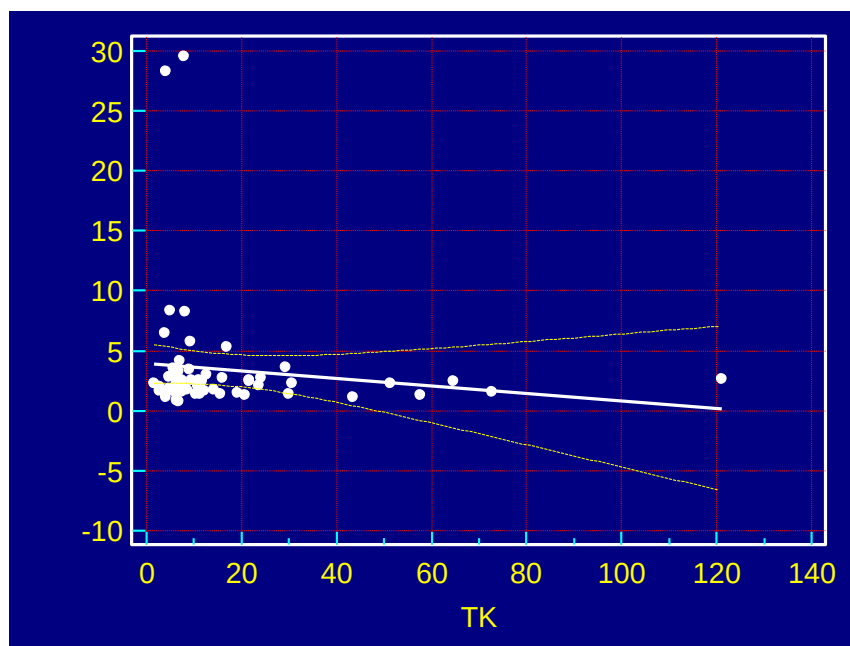


Graf 23: Izračun korelacije za NHL v remisiji

Izračun korelacije za MIELOM:

Spremenljivka Y	B2MG
Spremenljivka X	TK

Število vzorcev	59
Korelacijski koeficient r	-0,1259
Signifikacijska stopnja	P=0,3422 P>0,05; statistično neznačilna povezava
95% interval zaupanja za r	-0,3700 do 0,1346



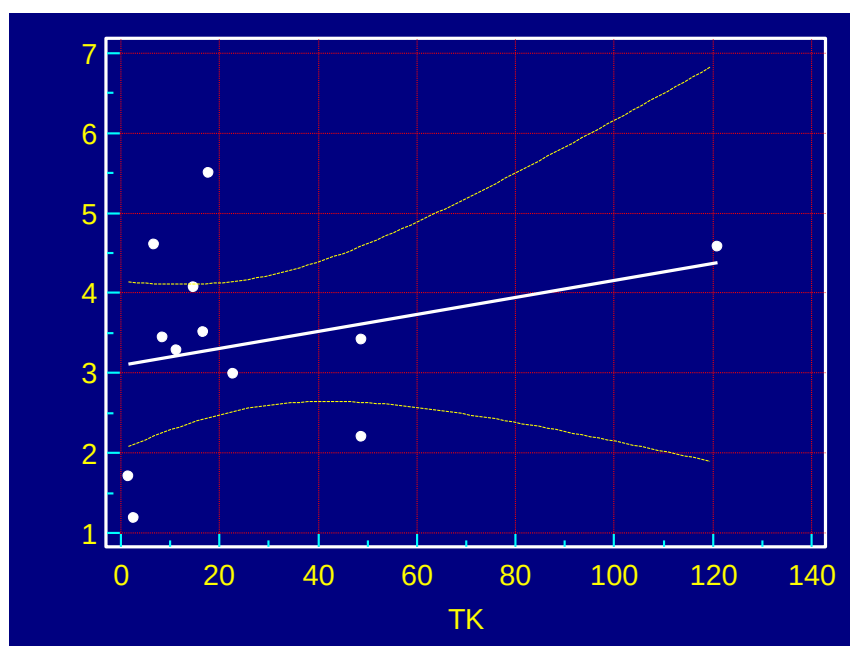
Graf 24: Izračun korelacije za Mielom v remisiji

4.3.4 Izračuni korelacij v relapsu

Izračun korelacije za NHL:

Spremenljivka Y	B2MG
Spremenljivka X	TK

Število vzorcev	12
Korelacijski koeficient r	0,2856
Signifikacijska stopnja	P=0,3682 P>0,05; statistično neznačilna povezava
95% interval zaupanja za r	-0,3448 do 0,7385

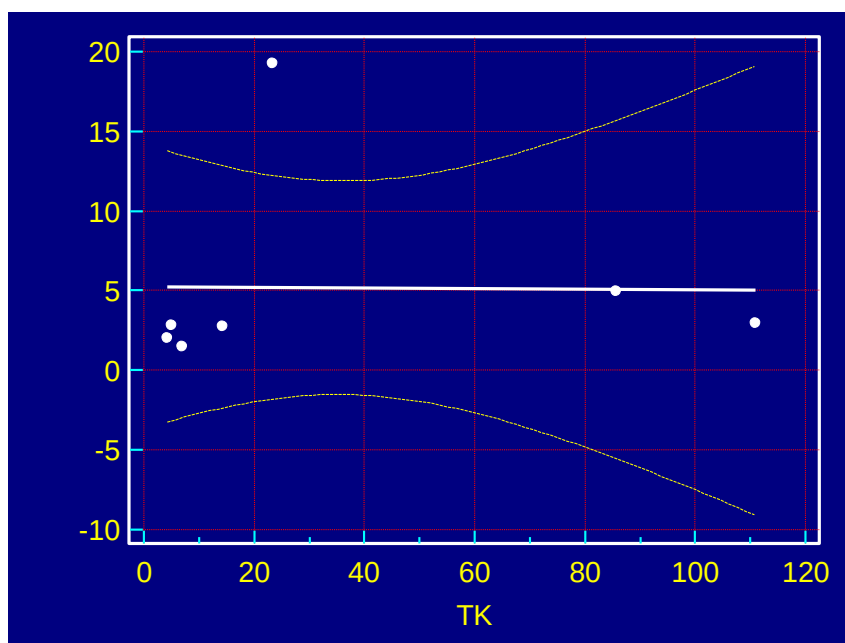


Graf 25: Izračun korelacije za NHL v relapsu

Izračun korelacije za MGUS:

Spremenljivka Y	B2MG
Spremenljivka X	TK

Število vzorcev	7
Korelacijski koeficient r	-0,01576
Signifikacijska stopnja	P=0,9732 P>0,05; statistično neznačilna povezava
95% interval zaupanja za r	-0,7598 do 0,7462



Graf 26: Izračun korelacije za MGUS v relapsu

5 Razprava

Pri raziskavi naših preiskovancev smo pri NHL analizirali skupno 72 vzorcev, moških je bilo 64%, skupna povprečna starost je bila 70 let, največje št. osebkov je bilo starih med 70 in 79 let. Pri mielomu smo skupno analizirali 59 vzorcev, od tega je bilo 59% moških, skupna povprečna starost je bila 62,84 let, največje število osebkov je bilo starih med 50 in 59 let. Pri AML smo skupno analizirali 40 vzorcev, od teh je bilo 55% moških, skupna povprečna starost je bila 55,75 let, največje št. osebkov pa je bilo starih med 50 in 59 let. Pri ALL smo skupno analizirali 16 vzorcev, od tega je bilo 69% moških, skupna povprečna starost je bila 37,38 let, največje število osebkov je bilo starih med 30 in 39 let. Najmanjše število preiskovancev je bilo prisotnih pri analizah za MGUS in sicer skupno 7, od tega je bilo 71% moških, skupna povprečna starost je bila 62,28 let, največje število osebkov pa je bilo starih med 70 in 79 let. Pri vseh boleznih so tako v porastu predvsem osebki moškega spola, povprečne starosti so večinsko ekvivalentne in se gibljejo od 55,57 do 69,98 let, le pri ALL smo opazili povprečno starost pod 40 let.

Na podlagi dobljenih rezultatov in obdelave podatkov smo ugotovili, da je bilo v stanju remisije pri določanju TK največje število povišanih vrednosti pri mielomu, in sicer 76,27% preiskovancev (tako moških kot žensk), sledi ji NHL s 67,79% povišanostjo, ALL s 60% in AML z 58,33%. Pri določanju β -2-MG v stanju remisije smo skupno opazili 50% povišane vrednosti pri NHL in 44,06% povišanost pri mielomu.

Določanje TK v relapsu je pokazalo najvišje vrednosti in sicer 100% pri ALL in AML, sledi jima NHL z 83,33% povišanih rezultatov in MGUS z 71,42% povišanostjo. Največje število povišanih vrednosti β -2-MG pa je bilo moč opaziti pri NHL s 75% in MGUS-U z 71,42% povišanostjo.

Znotraj posameznih bolezni kažejo dobljeni rezultati tako za TK kot za β -2-MG večji delež povišanih vrednosti v fazi relapsa kot v fazi remisije. Takšen trend je mogoče opaziti pri AML pri določanju TK, kjer je delež povišanih vrednosti 41,67%, pri ALL pri določanju TK, kjer je povišanost 40%, in pri NHL, kjer je pri določanju TK 18,46% povišanost ter pri določanju β -2-MG, kjer je v relapsu delež povišanih vrednosti glede na remisijo 33,33%.

Glede na dobljene rezultate lahko sklepamo, da sta TK in β -2-MG dobra prognostična označevalca, saj smo pri obeh dokazali večji delež povišanih vrednosti v fazi relapsa, predvsem lahko to trdimo za TK, kjer je bilo ta trend moč opaziti pri treh boleznih, medtem ko smo lahko pri β -2-MG to opazili samo pri eni bolezni. Povišane vrednosti v času remisije pri obeh tumorskih označevalcih bi mele večjo prognostično vrednost v primeru, če bi poznali ozadje stanja bolezni in bi poznali trend rezultatov, saj bi padec lahko kazal na uspešnost terapije, oziroma bi v primeru naraščanja trenda lahko potrdili neuspešnost zdravljenja in posledičnega pojava relapsa.

Izračunani korelacijski koeficienti v fazi remisije za NHL znašajo ($r=0,1790$) pod 0,2, kar kaže na minimalno in tako rekoč zanemarljivo povezanostjo med TK in B2MG, korelacijski koeficient za mielom pa ($r=-0,1259$) nad -0,2, kar kaže na minimalno in tako rekoč zanemarljivo linearno obratno sorazmernost med tumorskima označevalcema, kar pomeni, da lahko oba služita, statistično gledano, kot samostojna tumorska označevalca.

Izračunani korelacijski koeficienti v fazi relapsa za NHL znašajo ($r=0,2856$) pod 0,3, kar kaže na ponovno minimalno in tako rekoč zanemarljivo linearno povezanost med TK in B2MG, korelacijski koeficient za MGUS pa ($r=-0,01576$) nad -0,02, kar je skoraj enako 0 in tako linearne povezanosti med njima ni, tako da lahko za oba trdimo pri obeh boleznih, da služita, statistično gledano, kot samostojna tumorska označevalca.

Izračuni korelacij so nam pokazali, da med TK in B2MG ni korelacije, ne v fazi remisije za NHL in mielom ne v fazi relapsa za NHL in MGUS. Vzrok, zakaj je temu tako, bi lahko bila dejanska linearna nepovezanost med tumorskima označevalcema, vendar pa bi za dokaz tega potrebovali večjo skupino osebkov, pri katerih bi iskali njuno sorazmerje, vzrok bi lahko bila tudi nehomogena skupina ali pa naključno izbrani preiskovanci. Večjo specifičnost bi lahko zagotovili z dodatnimi hkratnimi analizami še katerih drugih tumorskih označevalcev, z zaporednimi meritvami skozi trajanje bolezni in procesom zdravljenja ter z nadzorovano izbrano množico preiskovancev. Tako bi dobili dodatne podatke o ostalih meritvah, lažje in z večjo verjetnostjo bi iskali korelacijsko odvisnost, z določeno skupino preiskovancev bi omejili ostale nepomembne interference in se omejili na iskane vrednosti ter si s tem zagotovili lažjo in kvalitetnejšo obdelavo ter interpretacijo rezultatov.

Seveda ne smemo pozabiti omeniti tudi bioloških dejavnikov, ki lahko vplivajo na serumske koncentracije tumorskih označevalcev. Zavedati se moramo, da idealnega tumorskega označevalca, s katerim bi lahko zagotovo potrdili nek maligni proces, ni, saj se lahko določene snovi pojavljajo v normalnem procesu življenja in niso nujno spremljevalci bolezenskih stanj ali pa so tudi, vendar

lahko gre tudi za drugačna obolenja, kot so različna vnetja, bolezni trebušne slinavke, jeter in tako niso plod malignih stanj. Tako lahko sklepamo, da tudi pri naši raziskavi obstaja možnost lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov.

Za analizo smo uporabili kemiluminiscenčno metodo, ki je ne izotopna, hitra in bistveno cenejša od radioimunološke metode, ki je zamudnejša, ker je večina dela ročnega, čas inkubacije pa zelo dolg. LIAISON nam s kemiluminiscenčno metodo omogoča hitro, popolnoma avtomatizirano metodo, kjer je človeški faktor skorajda izključen in je možnost napak občutno manjša.

6 Sklep

Skupni delež vseh povišanih serumskih koncentracij smo odkrili pri 67,1% preiskovancev.

Serumske koncentracije tumorskih označevalcev po statistični obdelavi med seboj niso povezane, kjer je bilo moč izračunati korelacijski koeficient.

Za dokaz, da obstaja korelacija pri različnih boleznih med TK in B2MG, bi potrebovali večjo množico vzorcev.

Obstajajo tudi drugi dejavniki, ki vplivajo na serumske koncentracije tumorskih označevalcev in niso povezani z nastankom novotvorbe.

Kemiluminiscenčna metoda za določanje TK in B2MG je v primerjavi z RIA metodo uporabnejša, hitrejša, cenejša, z manj možnosti faktorja človeške napake, hkrati pa je onemogočena izpostavljenost radioaktivnim izotopom, ki je naša tehnika na LIAISONU ne zajema.

Literatura

1. Nada Majkić-Stingh, TUMORSKI MARKERI: BIOHEMIJA I KLASIFIKACIJA, Jugoslov Med Biohem 25: 79-88, 2006
2. Nada Majkić-Stingh, ENZIMI KAO TUMORSKI MARKERI, Jugoslov Med Biohem 25: 127-135, 2006
3. Dan L. Longo / Kenneth C. Andersson / Kyle RA / Rajkumar SV / Lea JR / Griffiths: Multiple myeloma, 2010
URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Multiple_myeloma
4. Larking-Pettigrew M / Ranich T / Kelly R / Murakami H / Irisawa H/ Saitoh T: Monoclonal gammopathy of undetermined significance, 2010
URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Monoclonal_gammopathy_of_undetermined_significance
5. James R. Berenson: Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS), 2008
URL: <http://www.merck.com/mmpe/sec11/ch144/ch144d.html>
URL: http://www.merck.com/media/mmpe/pdf/Table_144-1.pdf
6. Diasorin S.p.A: <http://www.diasorin.com/upload/prodottiesistemi/TK.pdf>
7. Apostolia-Maria Tsimberidou / Sijin Wen / Sherry Pierce / Jorge Cortes / Mark Brandt: The Prognostic Significance of Serum β_2 Microglobulin Levels in Acute Myeloid Leukemia and Prognostic Scores Predicting Survival: Analysis of 1,180 Patients, 2007
URL: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/14/3/721.full?sid=041e2d3a-f749-4380-9768-d5c186ae1b96>
8. P D Gorevic / T T Casey / W J Stone / C R DiRaimondo / F C Prelli / B Frangione : Beta-2 microglobulin is an amyloidogenic protein in man, 1985
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC424400/>

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC424400/pdf/jcinvest00126-0401.pdf>

9. Walter JB / Garboczi DN / Fan QR / Zhou X / Walker BD / Eisen HN: A mutant human beta2-microglobulin can be used to generate diverse multimeric class I peptide complexes as specific probes for T cell receptors, 1998

URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9692857>

10. Ikee R / Honda K / Oka M / Maesato K / Mano T / Moriya H / Ohtake T / Kobayashi S: Association of heart valve calcification with malnutrition-inflammation complex syndrome, beta-microglobulin, and carotid intima media thickness in patients on hemodialysis, 2008

URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19140844>

11. Chen CH / Su CY / Chien CY / Huang CC / Chuang HC / Fang FM / Huang HY / Chen CM / Chiou SJ: Overexpression of beta2-microglobulin is associated with poor survival in patients with oral cavity squamous cell carcinoma and contributes to oral cancer cell migration and invasion, 2008

URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18841160>

12. Mario Boccadoro / Paola Omedè / Roberto Frieri / Silvano Battaglio / Gabriele Gallone / Massimo Massaia / Valter Redoglia / Alessandro Pileri: Multiple Myeloma: Beta-2-Microglobulin is not a Useful Follow-Up Parameter, 2009

URL: <http://content.karger.com/ProdukteDB/produkte.asp?Doi=205322#AC>

13. William B. Ershler: Beta-2 Microglobulin in AML, 2008

URL: <http://www.thefreelibrary.com/Beta2+Microglobulin+in+AML.a0196822412>

14. Thomas / Clayton L / Pagana / Kathleen D / Timothy J: Tumor Markers, 2001

URL:http://www.labtestsonline.org/understanding/analytes/tumor_markers/glance.html

15. Thomas / Clayton L / Pagana / Kathleen D / Timothy J / Abramson,N / Melton B: Leukemija, 2010

URL: <http://www.labtestsonline.org/understanding/conditions/Leukemia.html>

16. DiaSorin LIAISON[®] β Microglobulin (REF 314501), Instructions

17. DiaSorin LIAISON[®] Tymidine kinase (REF310960), Instructions

18. Medcalc statistic software, 2010

URL: <http://www.medcalc.be>

19. Doc.dr. Barbara Jezeršek Novaković, dr.med. spec.inter. med.: Biološka zdravila so relativno manj toksična

URL: http://www.revija-vita.com/Tarena_zdravila/Bioloska_zdravila_so_relativno/bioloska_zdravila_so_relativno.html?bcsi_scan_EE59D3D3EA24766D=0&bcsi_scan_filename=bioloska_zdravila_so_relativno.html

20. Kocijančič A / Mrevlje F: Bolezni krvi in krvotvornih organov, Interna medicina, Ljubljana: EWO, 1993

21. Grašič Kuhar Cvetka / Matos Erika / Pajk Bojana / Smrdel Uroš / Zakotnik Branko: Model of artificial neural networks (ANN) - help for clinicians in selecting adjuvant treatment in breast cancer patients, 2005

URL: <http://www.ist-world.org/ProjectDetails.aspx?ProjectId=6abc23194065480eb7c392804698bb93>

Priloge

NHL v remisiji

Št. Vzorca	Spol	Starost	Datum odvzema	TK	β-2-MG
1	Ž	77	23.01.	30,3	3,48
2	M	78	29.01.	28,7	4,24
3	Ž	80	29.01.	3,7	1,56
4	M	73	30.01.	7,1	3,88
5	Ž	61	30.01.	9	2,07
6	M	84	01.02.	31,1	5,31
7	M	54	05.02.	1,1	1,46
8	Ž	84	05.02.	3,9	2,46
9	M	67	06.02.	23,1	2,85
10	M	81	07.02.	8,4	1,73
11	M	67	07.02.	9,5	1,55
12	M	74	07.02.	5,3	4,92
13	M	60	07.02.	1,3	1,29
14	M	73	12.02.	27,5	5,9
15	Ž	64	13.02.	15,4	4,11
16	M	67	14.02.	3,5	2,6
17	Ž	72	21.02.	111	2,09
18	M	73	21.02.	11,2	1,1
19	Ž	53	26.02.	14	1,37
20	M	77	27.02.	5	2,71
21	M	71	28.02.	101	1,36
22	M	56	28.02.	13,5	1,38
23	Ž	68	29.02.	37,8	1,83

24	M	89	29.02.	6,5	4,28
25	M	48	04.03.	16,7	2,39
26	M	85	06.03.	20,1	4,84
27	Ž	58	06.03.	6,4	1,66
28	M	66	06.03.	1,4	2,25
29	Ž	60	06.03.	30,1	1,68
30	M	81	06.03.	8,9	1,88
31	M	83	11.03.	81,1	2,12
32	Ž	74	11.03.	85,9	2,88
33	M	57	11.03.	9,7	1,86
34	Ž	82	11.03.	4,6	2,52
35	Ž	59	11.03.	8,2	2,98
36	M	77	12.03.	3,4	2,2
37	Ž	79	13.03.	101	6,95
38	M	73	13.03.	1,5	3,3
39	M	74	13.03.	15,2	3,69
40	M	74	13.03.	16,5	7,23
41	Ž	76	13.03.	3,5	1,98
42	M	78	18.03.	22,4	3,65
43	M	61	18.03.	12,7	1,38
44	M	74	18.03.	10,2	2,56
45	M	72	19.03.	6,3	1,68
46	M	55	19.03.	23,7	3,12
47	M	67	20.03.	61,8	2,42
48	M	57	20.03.	3,2	1,29
49	M	69	20.03.	3,6	1,79
50	Ž	57	25.03.	5,3	1,45
51	Ž	72	25.03.	16,3	3,75

52	Ž	78	25.03.	7,4	1,86
53	M	56	27.03.	24,9	3,17
54	M	69	27.03.	39,3	3,42
55	M	72	27.03.	37,2	4,41
56	M	80	01.04.	2,4	1,43
57	Ž	72	03.04.	3,7	1,62
58	Ž	50	03.04.	2,4	1,26
59	Ž	80	03.04.	3,7	6,96
60	Ž	62	09.04.	/	1,46

NHL v relapsu

Št. Vzorca	Spol	Starost	Datum odvzema	TK	β-2-MG
1	M	68	23.01.	17,7	5,51
2	M	78	23.01.	6,8	4,61
3	M	73	29.01.	121	4,58
4	Ž	67	29.01.	22,8	2,99
5	M	75	01.02.	48,7	2,2
6	Ž	81	28.02.	48,8	3,42
7	Ž	83	29.02.	11,3	3,29
8	M	62	13.03.	16,6	3,51
9	M	54	18.03.	1,5	1,71
10	M	70	01.04.	14,7	4,08
11	M	60	01.04.	2,5	1,19
12	Ž	78	01.04.	8,5	3,44

Mielom v remisiji

Št. Vzorca	Spol	Starost	Datum odvzema	TK	β-2-MG
1	M	48	22.1.2008	14,1	1,77

2	M	65	22.1.2008	6,2	2,94
3	M	37	22.1.2008	64,7	2,49
4	M	56	22.1.2008	43,4	1,1
5	M	62	22.1.2008	11	2,54
6	M	72	22.1.2008	5,6	3,57
7	M	52	22.1.2008	7,2	1,59
8	M	60	22.1.2008	21,6	2,48
9	Ž	57	22.1.2008	5,5	1,88
10	Ž	70	22.1.2008	6,5	2,28
11	M	71	22.1.2008	1,6	2,33
12	Ž	52	22.1.2008	12,2	1,7
13	M	54	22.1.2008	4,1	1,13
14	Ž	65	24.1.2008	4,7	1,85
15	M	74	29.1.2008	6,9	4,16
16	M	59	29.1.2008	19,1	1,52
17	M	56	29.1.2008	6,3	0,905
18	Ž	55	30.1.2008	15,9	2,75
19	Ž	68	5.2.2008	5,9	1,8
20	Ž	61	7.2.2008	11,3	1,38
21	M	62	14.2.2008	2,8	1,63
22	M	71	21.2.2008	7,3	1,95
23	Ž	54	26.2.2008	6,7	0,779
24	M	55	26.2.2008	2,7	2,04
25	Ž	63	26.2.2008	12,5	3,03
26	Ž	52	26.2.2008	51,4	2,27
27	M	50	26.2.2008	23,6	2,11
28	Ž	57	26.2.2008	7,9	29,57
29	Ž	83	26.2.2008	4,8	2,86

30	M	78	26.2.2008	29,9	1,4
31	M	55	26.2.2008	72,7	1,6
32	Ž	78	27.2.2008	24,1	2,76
33	M	75	28.2.2008	3,9	6,5
34	Ž	69	29.2.2008	10,3	1,39
35	Ž	62	29.2.2008	5	8,33
36	M	78	4.3.2008	11,6	2,48
37	M	52	4.3.2008	121	2,67
38	Ž	51	4.3.2008	57,6	1,34
39	M	55	11.3.2008	20,6	1,3
40	M	63	11.3.2008	6,7	3,31
41	M	72	11.3.2008	10,8	2
42	M	55	11.3.2008	9,2	5,75
43	M	69	13.3.2008	9,4	2,6
44	M	71	13.3.2008	8,1	8,29
45	Ž	81	13.3.2008	6,2	2,25
46	Ž	82	13.3.2008	16,9	5,3
47	Ž	59	18.3.2008	30,5	2,32
48	Ž	61	18.3.2008	15,5	1,38
49	Ž	63	18.3.2008	6,4	1,4
50	M	75	20.3.2008	6,1	1,94
51	M	72	20.3.2008	7,4	2,54
52	M	64	20.3.2008	21,7	2,55
53	M	65	20.3.2008	8,5	1,79
54	M	62	25.3.2008	4,8	1,64
55	Ž	51	25.3.2008	8,2	1,98
56	Ž	64	25.3.2008	7,4	1,59
57	Ž	50	27.3.2008	4	28,31

58	M	78	3.4.2008	9	3,42
59	M	57	3.4.2008	29,3	3,61

MGUS v relapsu

Št. Vzorca	Spol	Starost	Datum odvzema	TK	β-2-MG
1	Ž	49	29.1.2008	6,9	1,46
2	M	72	6.3.2008	14,2	2,78
3	M	54	20.3.2008	111	2,93
4	Ž	61	27.3.2008	5	2,86
5	M	55	27.3.2008	4,3	2,03
6	M	71	9.4.2008	23,3	19,26
7	M	74	5.2.2008	85,6	4,96

AML v remisiji

Št. Vzorca	Spol	Starost	Datum odvzema	TK
1	Ž	36	22.1.2008	3,3
2	Ž	33	22.1.2008	101
3	Ž	61	23.1.2008	9,9
4	Ž	59	24.1.2008	0,8
5	Ž	62	29.1.2008	3,2
6	M	57	30.1.2008	6,7
7	Ž	40	30.1.2008	6,3
9	Ž	76	1.2.2008	48,9
10	M	81	6.2.2008	65,3
11	Ž	50	6.2.2008	4,1
13	Ž	40	7.2.2008	1,9
14	M	45	13.2.2008	7,7
15	M	49	26.2.2008	5,2

16	M	50	26.2.2008	11,4
17	M	54	26.2.2008	111
18	Ž	72	27.2.2008	3,9
19	Ž	50	27.2.2008	11
20	M	60	28.2.2008	10,5
21	M	75	29.2.2008	32
22	Ž	66	29.2.2008	111
23	M	31	29.2.2008	14,3
25	M	54	4.3.2008	10
26	M	37	6.3.2008	5,8
27	Ž	50	6.3.2008	6,3
28	M	54	12.3.2008	13,7
29	M	61	13.3.2008	26
30	M	63	13.3.2008	15,5
31	M	74	18.3.2008	10,4
32	M	69	18.3.2008	5,2
33	Ž	52	19.3.2008	5,6
34	Ž	51	19.3.2008	24,9
35	M	66	25.3.2008	5,9
36	Ž	53	27.3.2008	3,7

AML v relapsu

Št. Vzorca	Spol	Starost	Datum odvzema	TK
1	M	8.7.1960	50	35,9
2	Ž	10.9.1957	53	35,3
3	M	29.2.1929	81	86,3
4	M	11.10.1955	55	91,6

ALL v remisiji

Št. Vzorca	Spol	Starost	Datum odvzema	TK
1	M	54	22.1.2008	2,1
2	Ž	29	23.1.2008	6,2
3	M	37	24.1.2008	3,5
4	M	45	29.1.2008	25,3
5	M	40	29.1.2008	7,5
6	M	36	21.2.2008	8,8
7	M	39	21.2.2008	14,7
8	M	21	27.2.2008	23,2
9	M	43	4.3.2008	7,9
10	Ž	26	6.3.2008	5,7
11	Ž	53	6.3.2008	57,1
12	M	30	12.3.2008	3
13	Ž	30	19.3.2008	35,7
14	M	29	25.3.2008	4
15	Ž	50	27.3.2008	5,3

ALL v relapsu

Št. Vzorca	Spol	Starost	Datum odvzema	TK
1	M	16.7.1974	36	50,6