

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŽELJKA VESELINOVIĆ

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŽELJKA VESELINOVIĆ

POMEN TUMORSKEGA OZNAČEVALCA CA125 PRI ENDOMETRIOZI

THE MEANING OF CA125 IN ENDOMETRIOSIS

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem., na Inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani. Pacientke so bile z Ginekološke klinike v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana. Meritve so bile opravljene na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm. spec. med. biokem. za mentorstvo. Hvala za vse napotke pri pisanju diplome, potrpežljivost in posredovano strokovno znanje. Hvala tudi doc. dr. Marku Anderluhu in prof. dr. Albinu Kristlu za dodatne napotke, nasvete in pomoč.

Zahvaljujem se tudi staršem in prijateljem za podporo in spodbudo ter vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri nastanku diplomske naloge.

Izjava

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

Ljubljana, 2011

Predsednik komisije: prof. dr. Albin Kristl

Član diplomske komisije: doc. dr. Marko Anderluh

KAZALO

POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
1. UVOD	1
1.1. ENDOMETRIOZA	1
1.2. VZROKI	1
1.2.1. Teorija retrogradne menstruacije (Sampsonova implantacijska teorija (J.A Sampson, 1927))	1
1.2.2. Teorija metaplazije celomskega epitelija (R.Meyer, 1919)	2
1.2.3. Indukcijska teorija	2
1.2.4. Teorija limfnega in žilnega razsoja	3
1.2.5. Teorija o nastanku endometrioze iz ostankov Müllerjevih vodov	3
1.2.6. Avtoimunska teorija (W.P Dmowski, 1981).....	3
1.2.7. Endokrini dejavniki	4
1.3. DEJAVNIKI TVEGANJA	4
1.3.1. Družinska povezava	4
1.3.2. Anatomske napake.....	4
1.3.3. Okoljski toksini	4
1.4. SIMPTOMI	5
1.5. KLASIFIKACIJA	6
1.6. PERITONEALNA ENDOMETRIOZA	8
1.7. ENDOMETRIOZA JAJČNIKA	9
1.8. GLOBOKA INFILTRATIVNA ENDOMETRIOZA	10
1.8.1. Histološka slika GIE.....	10
1.8.2. Lokacije GIE	10
1.9. ENDOMETRIOZA ČREVEESA	12
1.9.1. Simptomi	12
1.10. DIAGNOSTIKA ENDOMETRIOZE.....	13
1.10.1. FIZIČNI PREGLED.....	13
1.10.1.1. Vizualni pregled.....	13
1.10.1.2. Vaginalni pregled.....	13
1.10.1.3. Dvoročni pregled.....	13
1.10.2. LABORATORIJSKO TESTIRANJE	13

1.10.2.1. CA 125	13
1.10.2.2. CA 19-9	13
1.10.3. DIAGNOSTIČNA SLIKANJA.....	13
1.10.3.1. Sonografija	13
1.10.3.2. Magnetna resonanca	14
1.10.3.3. Diagnostična laparoskopija	14
1.10.4. PATOLOŠKA ANALIZA	14
1.11. ZDRAVLJENJE	15
1.11.1. ZDRAVLJENJE SIMPTOMA BOLEČINA	15
1.11.1.1. Nesteroidne protivnetne zdravilne učinkovine.....	15
1.11.1.2. Kombinirani oralni kontraceptivi.....	16
1.11.1.3. Progestini	16
1.11.1.4. Selektivni progesteron-receptor modulator	16
1.11.1.5. Androgeni.....	16
1.11.1.6. Inhibitorji aromataze.....	16
1.12. KIRURŠKO ZDRAVLJENJE ENDOMETRIOZE	17
1.12.1. Konservativne operacije.....	17
1.12.2. Definitivne metode zdravljenja	17
1.13. TUMORSKI OZNAČEVALCI	17
13.1. SPREMEMBA KONCENTRACIJE TO.....	18
13.2. DOLOČANJE TO.....	18
13.2.1. Radioimunska tehnika (RIA)	19
13.2.2. Encimskoimunska metoda (EIA).....	19
13.2.3. Luminimetrične – imunološke metode (lia)	20
13.3. SENZITIVNOST IN SPECIFIČNOST TUMORSKIH OZNAČEVALCEV	21
13.4. POMANJKLJIVOSTI TUMORSKIH OZNAČEVALCEV	21
13.5. DELITEV TUMORSKIH OZNAČEVALCEV.....	22
13.5.1. Onkofetalni proteini	22
13.5.2. Hormoni	23
13.5.3. Encimi	23
13.5.4. Tumor spremljajoči antigeni	24
13.5.5. Posebni serumski proteini.....	25
13.5.6. Skupina različnih serumskih označevalcev.....	26

2. NAMEN DELA.....	27
3. EKSPERIMENTALNI DEL	28
3.1. Opis bolnic.....	28
3.2. Imunska metoda s kemiluminiscenco	28
3.3. Vzorci.....	28
3.4. Razlaga testa	28
3.5. Princip metode.....	29
3.6. Material	29
3.6.1. Reagenčni material za 100 določitev	29
3.6.2. Priprava reagentov	30
3.7. Kalibracija	30
3.8. Postopek.....	30
3.9. Kontrola kakovosti.....	30
3.10. Izračun rezultatov.....	31
3.11. Območje meritve.....	31
3.12. Referenčno območje	31
3.13. Interference.....	31
3.14. Natančnost	31
3.15. Občutljivost	32
3.16. Omejitve pri metodi	32
4. REZULTATI	33
4.1. Statistična obdelava rezultatov	36
4.2. Specifičnost in občutljivost.....	39
5. RAZPRAVA	42
6. SKLEP	45
7. LITERATURA.....	46

KAZALO SLIK

Slika 1: Endometrioza	1
Slika 2: Retrogradna menstruacija.....	2
Slika 3: Avtoimunska teorija	3
Slika 4: Vpliv dioksina na nastanek endometrioze.....	5
Slika 5: Klasifikacija endometrioze.....	7
Slika 6: Črne lezije	8
Slika 7: Rdeče lezije	8
Slika 8: Subtilne lezije.....	9
Slika 9: Endometrioza jajčnika.....	10
Slika 10: Endometrioza na levem sakrouterinem ligamentu.....	11
Slika 11: Rektovaginalna endometrioza	11
Slika 12: Endometrioza mehurja	11
Slika 13: Mesta GIE endometrioze.....	12
Slika 14: Diagnostična laparoskopija	14
Slika 15: Histološka slika endometrioze	15
Slika 16: Direktna ELISA	20
Slika 17: Občutljivost.....	40
Slika 18: Graf občutljivosti CA 125	40
Slika 19: Specifičnost.....	41
Slika 20: Graf specifičnosti CA 125.....	42

KAZALO PREGLEDNIC

Tabela I: Mesta endometrioze/simptomi	5
Tabela II: Interference	31
Tabela III: Natančnost	31
Tabela IV: Koncentracije CA 125 v skupini z endometriozo in v kontrolni skupini	33
Tabela V: Statistični podatki skupine z endometriozo	36
Tabela VI: Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa za skupino z endometriozo	37
Tabela VII: Statistični podatki kontrolne skupine	37
Tabela VIII: Kolmogorov - Smirnov test za kontrolno skupino	38
Tabela IX: Izračun rangov	38
Tabela X: Izračuni Mann - Whitney testa	39
Tabela XI: Občutljivost in specifičnost	39

POVZETEK

Endometrioza je bolezen, pri kateri se pojavljajo endometrijske žleze s stromo zunaj maternične votline. To tkivo imenujemo ektopično tkivo. Obstaja veliko teorij nastanka endometrioze, vendar nobena od njih v celoti ne pojasni etiologije. Najširše sprejeta teorija je teorija retrogradne menstruacije ali Sampsonova implantacijska teorija, ki predpostavlja, da menstrualna kri med menstruacijo teče skozi jajcevode v peritonealno votlino, kjer se celice implantirajo. Poznanih je več vrst endometrioze, ki so odvisne od mesta pojava ektopičnega tkiva. Od mesta pojava so odvisni tudi simptomi.

Tumorski označevalci so snovi, ki jih proizvajajo maligne celice ali celice, ki so nastale v drugih celicah pod vplivom delovanja malignih celic. V diplomski nalogi smo se osredotočili predvsem na TO CA 125, ki je prisoten pri endometriozii in pri nekaterih drugih malignih ter benignih boleznih v povišani koncentraciji nad 35 kU/L, ter pri nekaterih fizioloških procesih in normalnih telesnih tkivih, kjer je TO prisoten v nizkih koncentracijah.

Z našo raziskavo smo želeli ugotoviti pomen tumorskega označevalca CA 125 pri endometriozii in določiti njegovo občutljivost ter specifičnost.

Analizirali smo vzorce 119 žensk z Ginekološke klinike v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana razdeljenih v dve skupini. Prva skupina, v kateri je bilo 25 preiskovank s postavljenjo diagnozo endometrioze in druga skupina, ki je bila kontrolna skupina s 94 preiskovankami brez endometrioze. Izračunali smo 56% občutljivost in 90% specifičnost TO CA 125. Izvedli smo tudi statistične teste za primerjavo vrednosti med seboj.

Povzamemo lahko, da čeprav ima TO CA 125 pomembno vlogo pri določanju endometrioze, ne moremo postaviti diagnoze samo na podlagi zvišanih koncentracij tega tumorskega označevalca. Za natančno diagnozo endometrioze je ključen postopek laparoskopije in ginekološki pregled.

ABSTRACT

Endometriosis is a disease where endometrial glands with stroma appear outside of the uterine. The tissue is called ectopic tissue. There are many theories about the formation of endometriosis but none of them completely defines the etiology. The most acceptable theory is the theory of retrograde menstruation or Sampsons theory that assumes that during menstruation menstrual blood recourses trough fallopian tubes in to the peritoneal cavity where cells implant. There are several kinds of endometriosis known that depend on the place where ectopic tissue appears. Symptoms vary in dependence in kind of endometriosis.

Tumor markers are substances that are produced in malignant cells or in cells that are influenced by malignant cells. In our diploma we focused mainly on tumor antigen CA 125 which is present in endometriosis and other malignant and benign diseases in high concentrations above 35 U/mL and in some physiological processes in normal body tissue in low concentrations.

In our research we wanted to determine the meaning of tumor antigen CA 125 in endometriosis and determine its specificity and sensitivity.

We analyzed 119 samples taken from female patients in Gynecology Division at the University Medical Centre Ljubljana. The samples were divided in to two groups. The first group was composed from 25 patients with diagnosis of endometriosis. The second group was the control group with 94 patients who didn't have endometriosis. We calculated 56% sensitivity and 90% specificity. We also performed some statistic tests to compare the values among them.

We can summarize that although tumor antigen CA 125 has an important role in diagnosing endometriosis we cannot set the diagnosis only on the basis of its concentrations higher than 35 U/mL. For an accurate diagnosis it is crucial to do a gynecology exam and a laparoscopy.

SEZNAM OKRAJŠAV

AF – alkalna fosfataza

AFP – alfa feto protein

β HCG – beta choriogonadotropin; horigonadotropin

CA – carcinom antigen; karcinomski antigen

CEA – Carcinoembryonic antigen; karcinoembrionalni antigen

COX 1,2 – Cyclooxygenase type 1 and 2; ciklooksigenaza tipa 1 in 2

DMPA - depot medroxyprogesterone acetate; depo medroksiprogesteron acetat

GGT – gama glutamil transpeptidaza

H&E barvanje – hematoksilin in eozin barvanje

IUD – intrauterine device; intrauterina naprava

LDH – laktat dehidrogenaza

LH – luteinizirajoči hormon

MCA – mucin carcinoma antigen; mucinski karcinomski antigen

NSE – nevronska specifična enolaza

PKF – prostatična kislina fosfataza

SHBG – sex – hormone – binding globulin; globulin, ki veže spolne hormone

SPRMs – Selective progesterone receptor modulators; selektivni progesteron-receptor modulator

TCDD – tetrachlorodibenzo-p-dioksin; tetraklorodibenzo-p-dioksin

TG - tiroglobulin

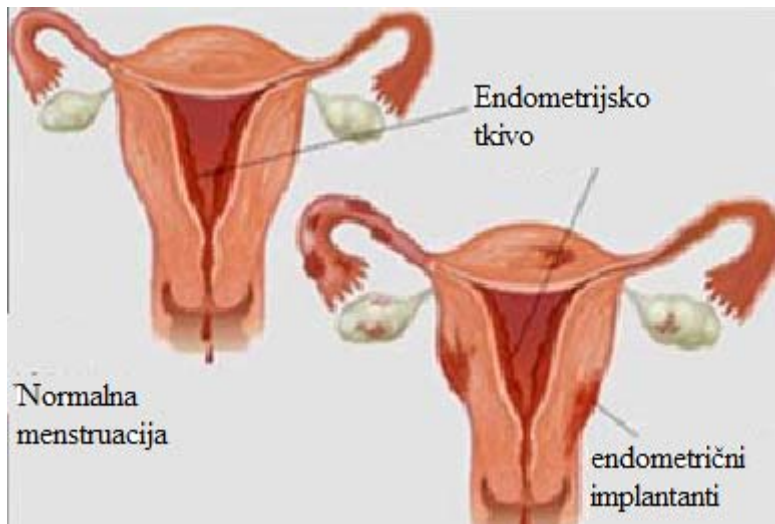
TK – timidin kinaza

TO – tumorski označevalec

1. UVOD

1.1. ENDOMETRIOZA

Endometrijoza je bolezen, pri kateri se pojavljajo endometrijske žleze s stromo zunaj maternične votline. To tkivo imenujemo ektopični endometrij. Ta se od evtopičnega endometrija, ki je normalno prisoten v maternici, razlikuje predvsem po tem, da nima velikih mitohondrijev, pa tudi po estrogenskih in progesteronskih receptorjih, ki jih je v ektopičnem endometriju manj. Spremembe, ki jih povzroči delovanje hormonov v ektopičnem endometriju, ne korelirajo s tistimi v evtopičnem endometriju, v lutealni fazi cikla ne zasledimo sekretornih sprememb. Oba endometrija se razlikujeta tudi po vsebnosti različnih encimov in izraznosti genov (1).



Slika 1: Endometrijoza

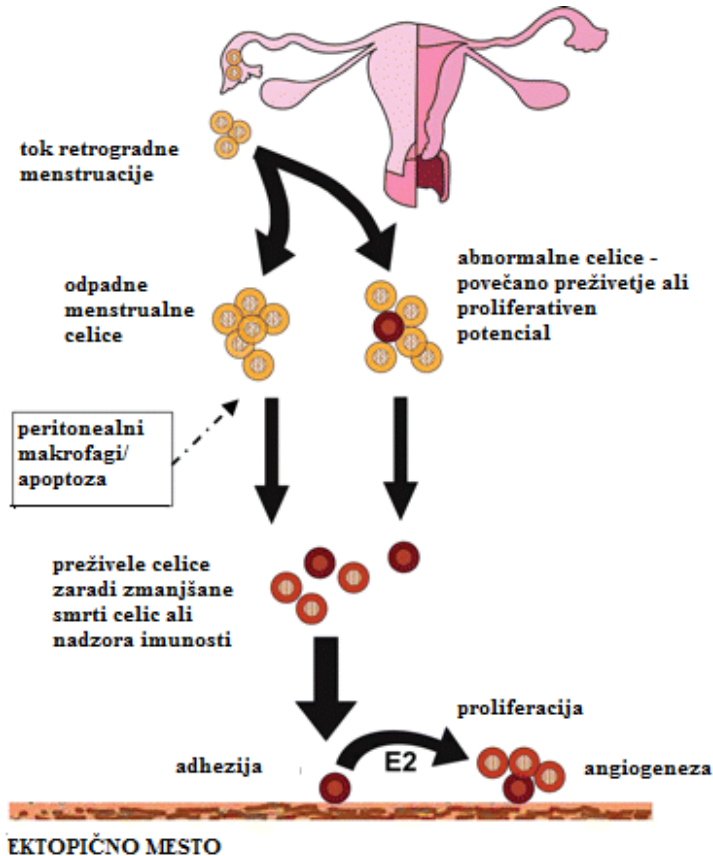
1.2. VZROKI

Vzroke za nastanek endometrijoze poskuša razjasniti več teorij, od tega nobena v celoti ne pojasnjuje etiologije.

1.2.1. Teorija retrogradne menstruacije (Sampsonova implantacijska teorija (J.A Sampson, 1927))

Prva in najširše sprejeta teorija predpostavlja, da menstrualna kri med menstruacijo teče skozi jajcevede v peritonealno votlino, kjer se celice implantirajo (1). Trije bistveni pogoji morajo biti izpolnjeni, da razmišljamo o retrogradni menstruaciji kot o vzroku za endometrijozo. Endometrijske celice morajo vstopiti v peritonealno votlino skozi jajčnike,

celice znotraj menstruacijske krvi morajo biti sposobne preživetja in se zmožne presaditi v medenične strukture, anatomski rasporeditev endometrioze v medenični votlini mora korelirati z načeli transplantacije odluščenih celic (2). Veliko vlogo imajo hormonski, vnetni in imunološki dejavniki (1).



Slika 2: Retrogradna menstruacija

1.2.2. Teorija metaplazije celomskega epitelijskega (R.Meyer, 1919)

Razlaga nastanek endometrioze s preoblikovanjem celic seroznih membran (1). Degeneriran endometrijski sprošča faktorje, ki inducirajo metaplazni proces seroznega epitelijskega jajčnikov in mezotelija. Nastane tkivo z značilnimi endometrijskimi žlezami in stromo (6). V prid tej teoriji govori pojav endometrioze pri ženskah, ki nimajo retrogradne menstruacije (1), pri ženskah po menopavzi in ženskah pred menstruacijo (3).

1.2.3. Indukcijska teorija

Je razširjena teorija metaplazije celomskega epitelijskega, ki pojasnjuje nastanek endometrioze s tem, da endogeni biokemični ali imunokemični dejavniki, ki jih vsebuje endometrijski, povzročijo diferenciacijo nediferenciranih peritonealnih celic v endometrijske (1). Prav tako lahko diferenciacijo povzročijo okoljski dejavniki (3).

1.2.4. Teorija limfnega in žilnega razsoja

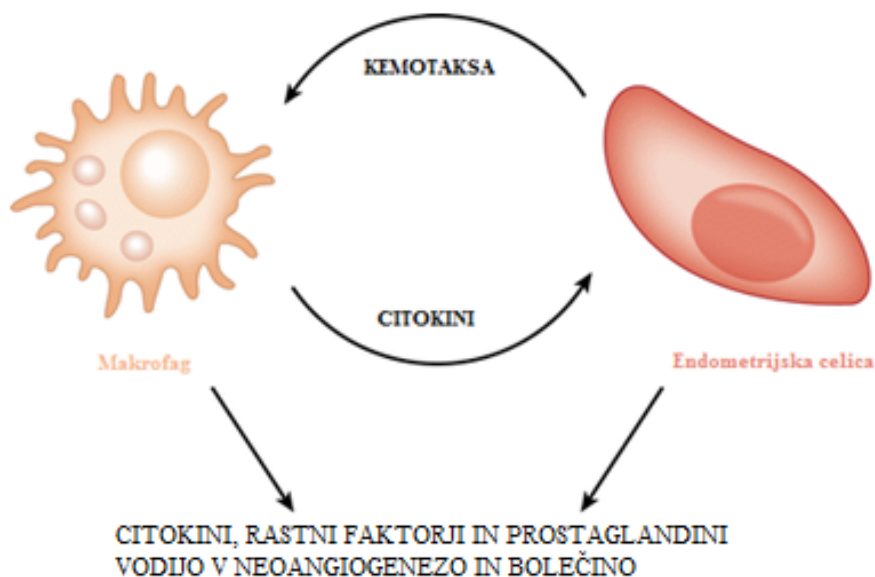
Pravi, da lahko celice endometrija transplantirajo na ektopična mesta po limfnih poteh ali po krvi. Te celice imajo sposobnosti, ki jim omogočajo implantacijo v tujem okolju (6). S to teorijo lahko razložimo pojav endometrioze na oddaljenih delih kot so ledvice, pljuča, plevra, popek, maternični vrat in nožnica (1).

1.2.5. Teorija o nastanku endometrioze iz ostankov Müllerjevih vodov

Po tej teoriji nastane endometrija iz pluripotentnih embrionalnih celic, ki se diferencirajo v funkcionalne endometrijske celice. S to teorijo razlagamo nastanek endometrioze rektovaginalnega septuma (1).

1.2.6. Avtoimunska teorija (W.P Dmowski, 1981)

Hipoteza, da je endometrija odsev pomanjkljive celične imunosti izhaja iz ugotovitve, da je retrogradna menstruacija veliko pogostejša od endometrioze in da vse ženske z retrogradno menstruacijo ne razvijejo endometrioze (1). Menstrualno kri retrogradne menstruacije v peritonealni votlini običajno odstranijo imunske celice kot so makrofagi, naravne celice ubijalke (NK) in limfociti. Iz teh razlogov je disfunkcija imunskega sistema eden možnih mehanizmov pri ženskah z endometrijo, ob prisotnosti retrogradne menstruacije (3). To teorijo so podprli tudi nekateri drugi avtorji, ki so ugotovili, da gre pri endometriji tudi za spremembo humoralne imunosti. V serumu in cervikalnem izločku žensk z endometrijo najdemo avtoprotitelesa IgG in IgA proti tkivu maternične sluznice in jajčnika (1).



Slika 3: Avtoimunska teorija

1.2.7. Endokrini dejavniki

Endometrioza je hormonsko odvisna bolezen. V patogenezi ima pomembno vlogo metabolizem estrogenov. Ekspresija aromataze, ki katalizira sintezo estrona in estradiola, je v evtopičnem endometriju žensk, ki nimajo endometrioze majhna oz. je sploh ni, kar se razlikuje od endometriomov in zunajovarijske endometrioze. Nizke vrednosti aromataze mRNA so odkrili tudi v evtopičnem endometriju žensk z zmerno in hudo endometriozo. Te ugotovitve govorijo v prid hipotezi, da gre pri ženskah z endometriozo za gensko napako v izraznosti aromataze (1).

1.3. DEJAVNIKI TVEGANJA

1.3.1. Družinska povezava

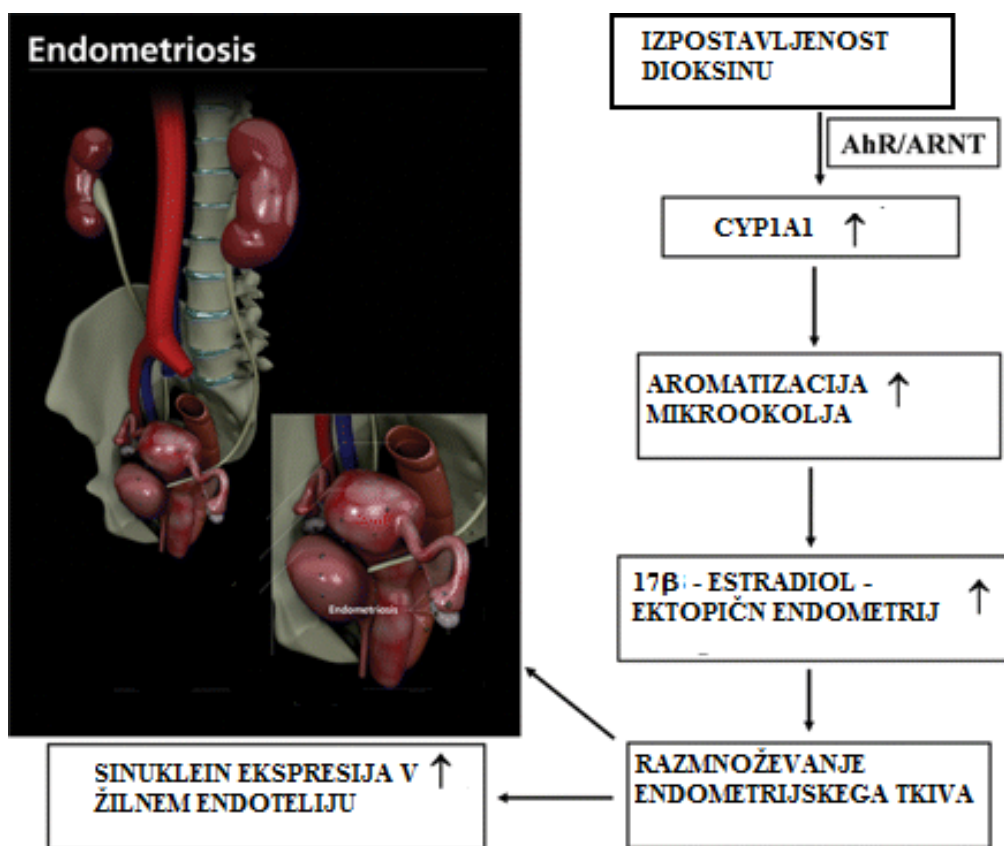
Obstajajo dokazi o sorodstvenih vzorcih dedovanja endometrioze. Čeprav s kvalitativno genetiko ni bil ugotovljen noben vzorec, povečana incidenca sorodnikov v prvem kolenu kaže na poligensko/multifaktorsko dedovanje. Primer: genetska študija žensk z endometriozo je pokazala, da je 5.9% ženskih otrok matere z endometriozo obolelo za endometriozo. Nadaljnje raziskave so pokazale, da imajo ženske z endometriozo in obolelo sorodnico v prvem kolenu večje možnosti za hudo endometriozo (61%), kot tiste brez obolele bližnje sorodnice (24%).

1.3.2. Anatomske napake

Obstrukcija reproduktivnega trakta je lahko predispozicija za endometriozo, verjetno zaradi poslabšanja retrogradne menstruacije. Med drugim je endometrioza bila ugotovljena pri ženskah z nekomunikacijskim materničnim rogom, zaprtim himenom in transverzalnim vaginalnim septumom. Za te anomalije je predlagano, da se identificirajo in zdravijo z laparoskopom v času korektivne operacije, saj je mišljeno, da popravi te anomalije lahko zmanjša možnost za endometriozo.

1.3.3. Okoljski toksini

Številne študije nakazujejo, da izpostavljenost določenim okoljskim toksinom vpliva na nastanek endometrioze. Najpogosteje se omenja TCDD in drugi dioksini. TCDD aktivira aril ogljikovodikov receptor, ki funkcionira kot osnovni transkripcijski faktor in vodi do transkripcije številnih genov. TCDD v konjunkciji z estrogenom stimulira nastanek endometrioze in blokira progesteronsko indukcijo endometrioze. TCDD in ostali dioksini so produkti industrije.



Slika 4: Vpliv dioksina na nastanek endometrioze

1.4. SIMPTOMI

Ženske z endometriozo imajo velik razpon simptomov. Narava in resnost simptomov sta odvisni od lokacije ektopičnih endometrijskih lezij in razsežnosti bolezni. Nekatere ženske s hudo endometriozo nimajo znakov oz. imajo blage znake endometrioze, medtem ko imajo druge z minimalno endometriozo tako močne bolečine, da jih le te ovirajo pri delu (3).

Tabela I: Mesta endometrioze/simptomi

MESTO	SIMPTOMI
Ženski reproduktivni trakt	Dismenoreja (endometrijoza jajčnikov, GIE) Dispareunija (endometrijoza jajčnikov, GIE) Neplodnost (endometrijoza jajčnikov, GIE, peritonealna endometrijoza) Nizka abdominalna in medenična bolečina (endometrijoza jajčnikov, GIE, peritonealna endometrijoza)

	Bolečine v spodnjem delu hrbta (GIE)
Urinarni trakt	Ciklična hematurija (GIE) Ciklična disurija (GIE)
Gastrointestinalni trakt	Ciklična rektalna krvavitev (GIE) Dishezija (GIE)
Kirurške brazgotine/popek	Ciklične bolečine in krvavitve (GIE)
Pljuča	Ciklični hematopnevmotoraks in hemoptiza (GIE) (5)

Bolečine v medenici so pogosto (80%) prisotne pri ženskah z endometriozo (3). V nekaterih primerih bolečina ni izključno povezana z menstruacijo ali s spolnimi odnosi, ampak je kronična, nepopustljiva bolečina. Kronična bolečina je lahko povezana z medeničnimi brazgotinami v povezavi z endometriozo (7). Bolečina se začne pred menstruacijo, doseže najvišjo točko med menstruacijo in počasi pojenja (3).

Dispareunija ali boleči spolni odnosi se povezujejo z endometriozo, kadar ženska predhodno ni imela nobenih bolečin, le te se pojavijo nenadno. Stopnja neugodja je neodvisna od resnosti bolezni (7).

Motnje menstruacije prizadenejo okoli 20% žensk z endometriozo. Kažejo se v obliki menoragije, nerednih menstruacij, dismenoreje in predmenstrualnih madežev (3). Dismenoreja ali boleča menstruacija je lahko znak endometrioze predvsem takrat, ko se bolnica ne odziva na oralne kontraceptive in nesteroidne protivnetne agente (7).

Neplodnost se pojavi pri 30% žensk z endometriozo (3). Najpogostejši mehanizem za neplodnost je imunološki faktor znotraj peritonealne votline, ki inhibira normalno funkcijo gamet, kar zmanjšuje stopnjo oploditve (1).

1.5. KLASIFIKACIJA

Trenutno je v veljavi Spremenjena klasifikacija Ameriškega združenja za fertilitetnost in sterilnost (R-AFS), ki deli endometriozo na minimalno, blago, zmerno in hudo. Slaba stran klasifikacije je, da ne zajema globoke infiltrativne endometrioze in endometrioze ostalih organov (1).



**THE AMERICAN FERTILITY SOCIETY
REVISED CLASSIFICATION OF ENDOMETRIOSIS**

Patient's Name _____ Date _____

Stage I (Minimal) - 1-5
 Stage II (Mild) - 6-15
 Stage III (Moderate) - 16-40
 Stage IV (Severe) - >40
 Total _____

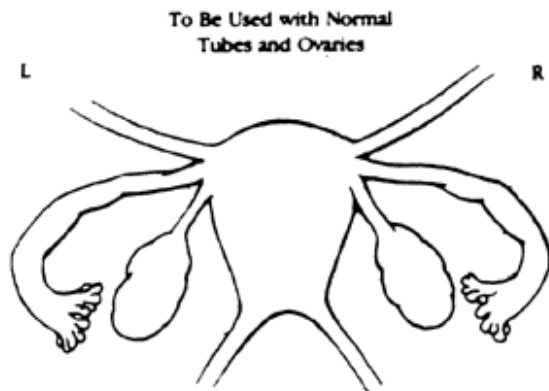
Laparoscopy _____ Laparotomy _____ Photography _____
 Recommended Treatment _____
 Prognosis _____

PERITONEUM	ENDOMETRIOSIS	< 1cm	1-3cm	> 3cm	
	Superficial	1	2	4	
Deep	2	4	6		
OVARY	R Superficial	1	2	4	
	Deep	4	16	20	
	L Superficial	1	2	4	
	Deep	4	16	20	
POSTERIOR CULDESAC OBLITERATION		Partial	Complete		
		4	40		
OVARY	ADHESIONS	< 1/3 Enclosure	1/3-2/3 Enclosure	> 2/3 Enclosure	
	R Filmy	1	2	4	
	Dense	4	8	16	
	L Filmy	1	2	4	
	Dense	4	8	16	
	TUBE	R Filmy	1	2	4
		Dense	4*	8*	16
		L Filmy	1	2	4
Dense		4*	8*	16	

*If the fimbriated end of the fallopian tube is completely enclosed, change the point assignment to 16.

Additional Endometriosis: _____

Associated Pathology: _____



A

Slika 5: Klasifikacija endometriozie

Danes splošno sprejeto mnenje je, da endometrijoza ni enotna bolezen in jo deli na tri različne oblike glede na etiologijo in patogenezo:

- Peritonealna endometrijoza
- Endometrijoza jajčnika
- Globoka infiltrativna endometrijoza oziroma rektovaginalna endometrijoza (1)

1.6. PERITONEALNA ENDOMETRIOZA

Peritonealna endometrijoza se pojavlja po peritoneju, serozi in površini jajčnika. Po klasifikaciji R-AFS jo opredelimo kot minimalno in blago. Nastanek najlažje, čeprav ne popolnoma pojasnimo s Sampsonovo teorijo retrogradne menstruacije. Vlogo pri nastanku igrajo tudi drugi dejavniki, predvsem imunološki.

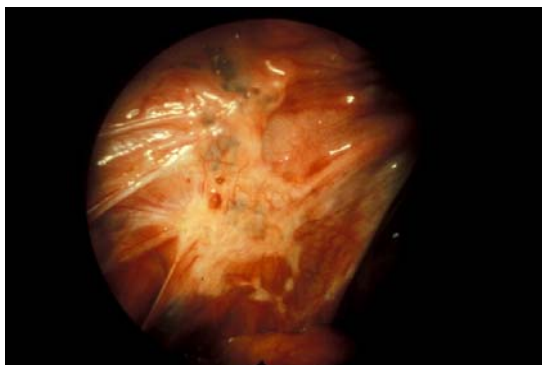
Peritonealna endometrijoza se pojavlja v različnih oblikah.

- Črne lezije so podobne glavicici ugasle vžigalice. So posledica krvavitve iz tkiva in retencije krvnega barvila, ki povzročata rjavo obarvanost lezij. Čeprav so črne lezije najbolj očitne, so najmanj aktivne in verjetno predstavljajo že izgorelo endometrijozo.



Slika 6: Črne lezije

- Rdeče lezije so verjetno najbolj aktivna oblika in začetek procesa.



Slika 7: Rdeče lezije

- Subtilne lezije se pojavljajo kot bela oziroma nebarvana endometriozii. Izgledajo kot brazgotine v peritoneju ali rahlo dvignjene nebarvane pege. Ta oblika je veliko krat spregledana, prav tako njen pomen. Ali gre za izgorelo endometriozii ali za začetek endometrioze ni znano. Prav tako se pogosto spregledajo vezikularne lezije, ki so videti kot prozorni polipi ali mehurčki in peritonealni žepki.



Slika 8: Subtilne lezije

1.7. ENDOMETRIOZA JAJČNIKA

Natančna patofiziologija endometrioze jajčnika ni znana. Obstaja več teorij. Strokovnjaki predvidevajo, da so endometriomi posledica metaplazije celomskega epitelija, ki pokriva jajčnik oz. funkcionalnih cist. Endometriomi so različnih velikosti, prosti ali fiksirani in stranski ali obojestranski. Po R-AFS klasifikaciji jih opredelimo kot:

- Blago endometriozii (II stopnja) – endometriomi so obojestranski ali enostranski, < 3 cm, prosti, brez zarastlin na sosednje organe;
- Zmerno endometriozii (III. stopnja) – endometriomi so enostranski ali obojestranski, >3 cm, vsaj en jajčnik je prost, mobilni
- Hudo endometriozii (IV. Stopnja) – endometriomi so enostranski ali obojestranski, >3 cm, jajčniki niso na svojem mestu (pri obojestranskem endometriomih), se stikajo med seboj in so zraščeni s sosednjimi organi. Obstaja velika verjetnost, da je prisotna globoka endometriozii.



Slika 9: Endometrijoza jajčnika

1.8. GLOBOKA INFILTRATIVNA ENDOMETRIOZA

O globoki infiltrativni endometrijozi (GIE) govorimo, kadar se endometrične lezije vraščajo več kot 5 mm v retroperitonealni prostor. Bolezen je prvi leta 1922 opisal J.A.Sampson kot popolno obliteracijo Douglasovega prostora. Obstajajo tri glavne hipoteze o nastanku te bolezni :

- GIE je posledica sekundarne infiltracije peritonealne endometrijoze
- GIE je posledica sekundarne infiltracije adenomioze
- Rektovaginalni endometrični nodusi so adenomiotični nodusi, katerih histopatogeneza je povezana z metaplazijo ostankov Müllerjevih vodov v rektovaginalnem septumu. Proces se običajno začne v rektovaginalnem septumu, od koder se širi na sosednja tkiva in organe. V uporabi je tudi izraz rektovaginalna endometrijoza.

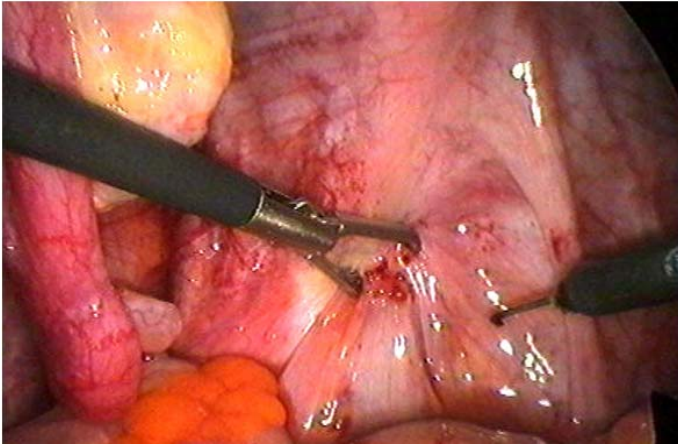
1.8.1. Histološka slika GIE

GIE ima značilno histološko sliko, pri kateri prevladujejo endometrične žleze, ki kažejo na različno stopnjo aktivnosti, pičla stroma, fibroza in hiperplazija gladkih mišičnih vlaken. Živčni končiči, obdani z vnetnimi celicami znotraj endometričnih implantatov in okrog njih, pa so glavni vzrok za bolečino. Včasih prevladuje samo fibroza.

1.8.2. Lokacije GIE

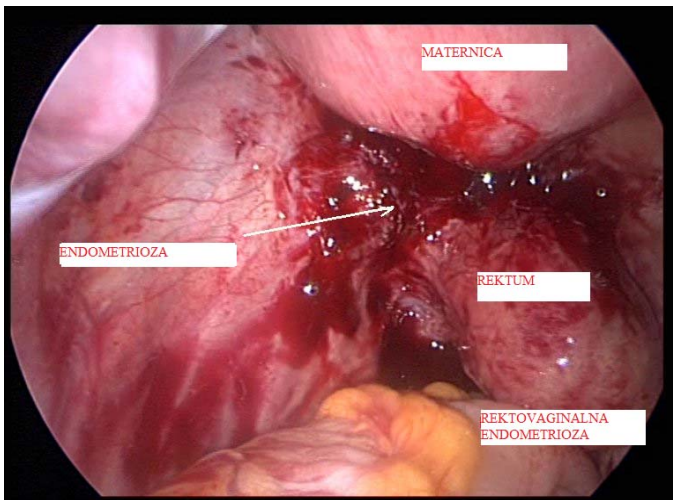
Najpogostejše lokacije GIE so:

- Sakrouterine vezi (70%)



Slika 10: Endometrijoza na levem sakrouterinem ligamentu

- Rektovaginalni septum (18%)



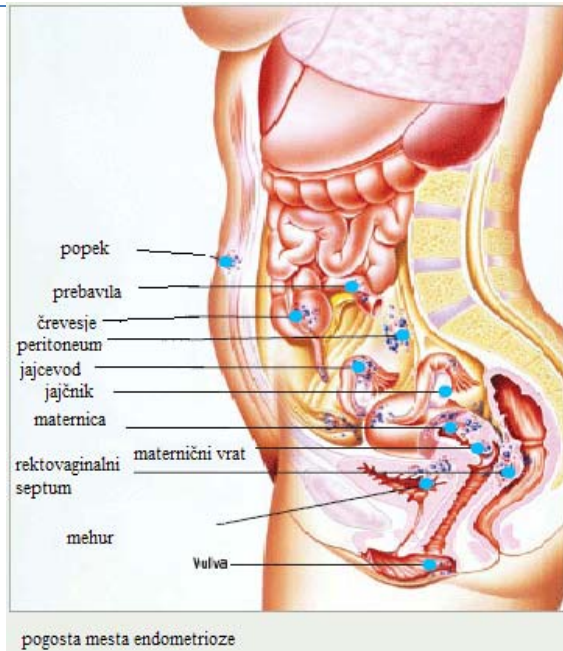
Slika 11: Rektovaginalna endometrijoza

- Sečevod in mehur (11%)



Slika 12: Endometrijoza mehurja

- Črevo (38%)



Slika 13: Mesta GIE endometrioze

1.9. ENDOMETRIOZA ČREVESA

Poleg ovarijev in peritoneja male medenice prizadene tudi črevo in sečila.

Diagnozo je večinoma težko postaviti, ker endometrijoza črevesa spominja na Chronovo bolezen, vnetje slepiča, diverkultitis ali karcinom debelega črevesa in danke.

Najpogostejši lokaciji bolezni sta sigmoidni kolon in rektum, ki sta prizadeta kar v 70 do 93 %. Na ileumu in slepiču se bolezen redkeje pojavlja, opisani so tudi primeri endometrijoze jejunuma. Globoka pelvična endometrijoza je lokalizirana v mali medenici in zajema Douglasov prostor, sakrouretralne ligamente in forniks vagine. Kadar endometrijoza prerašča v steno rektuma, govorimo o rektovaginalni obliki globoke pelvične endometrijoze. Največkrat se endometrijsko tkivo vrašča globoko v mišično plast, sluznica pa ostane neprizadeta. Nodusi endometrijoze lahko imajo premer nekaj mm, lahko so veliki kot tumorji, ki zajemajo vso steno črevesa. Majhni nodusi, ki se vraščajo v povrhnjo mišično plast ponavadi niso pomembni. Večji nodusi, ki se vraščajo globoko v mišični sloj lahko povzročijo zožitev svetline črevesa.

1.9.1. Simptomi

Poleg običajnih simptomov endometrijoze rodil se pojavijo še zaprtja, driske, kri v blatu, bolečina v rektumu pri odvajanju blata in meteorizem črevesja. Glavni simptomi endometrijoze črevesa so krčevite bolečine v trebuhu in predelu trtice, meteorizem med menstruacijo in znaki zapore črevesja. Pojav simptomov je povezan z menstruacijo (1).

1.10. DIAGNOSTIKA ENDOMETRIOZE

1.10.1. FIZIČNI PREGLED

1.10.1.1. Vizualni pregled

Pri vizualnem pregledu največkrat ne opazimo nepravilnosti, saj se endometrioza največkrat nahaja znotraj medenice. V nekaterih primerih najdemo endometriozo pri epitonomijskih brazgotinah in kirurških brazgotinah, najpogosteje znotraj Pfannenstielovega reza. Redko se endometrioza razvije spontano znotraj peritoneja ali peritonejske regije.

1.10.1.2. Vaginalni pregled

Pregled vagine in materničnega vratu ponavadi ne pokažeta znakov endometrioze. Občasno se opazijo modrikaste ali rdeče lezije na materničnem vratu ali vagini. Te lezije so lahko mehke in ob dotiku zakrvavijo. Zadnja raziskava je pokazala, da je 14% globoke infiltrativne endometrioze odkrite z pregledom z spekulom.

1.10.1.3. Dvoročni pregled

Palpacija medeničnih organov pogosto razkriva anatomske nepravilnosti, ki nakazujejo na endometriozo.

1.10.2. LABORATORIJSKO TESTIRANJE

Laboratorijske preiskave se pri endometriozii velikokrat podcenjujejo. Uporabljamo kompletno krvno sliko (KKS), urinske analize in kulture, vaginalne kulture in brise materničnega vratu za izključitev infekcij ali spolno prenosljivih bolezni.

1.10.2.1. CA 125

Številni tumorski markerji so vključeni v študije v povezavi z endometriozo. Najbolj raziskan je CA 125. Le ta korelira z resnostjo endometrioze. Njegova pomanjkljivost je slaba občutljivost pri blagi endometriozii.

1.10.2.2. CA 19-9

Tumorski označevalec 19-9 (CA 19-9), antigenski glikoprotein je še en serumski označevalec, ki pozitivno korelira z resnostjo endometrioze.

1.10.3. DIAGNOSTIČNA SLIKANJA

1.10.3.1. Sonografija

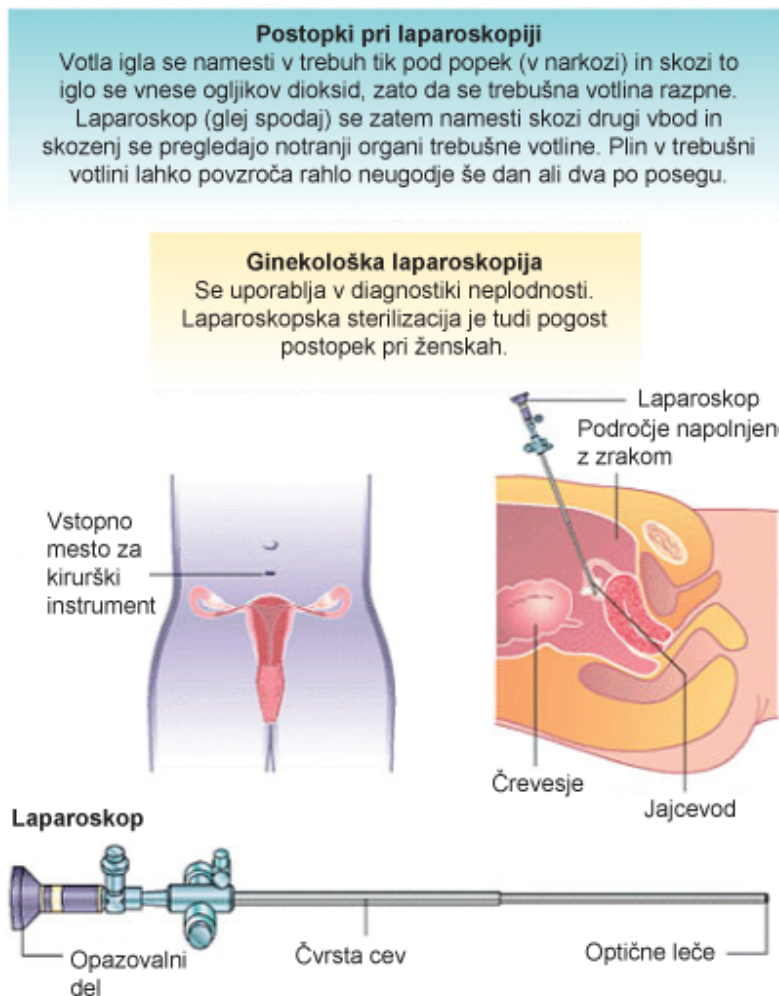
Obe transabdominalna in bolj občutljiva transvaginalna sonografija (TVS) se uporabljata za diagnostiko endometrioze. Čeprav je TVS pomembna metoda pri ocenjevanju simptomov povezanih z endometriozo in je natančna pri odkrivanju endometriomov, je pri prikazovanju površinskih endometrijskih lezij neustrezna.

1.10.3.2. Magnetna resonanca

Uporablja se kot neinvazivna metoda za diagnostiko endometrioze. Z magnetno resonanco lahko opazimo tudi majhne nodule in površinske endometrijske lezije.

1.10.3.3. Diagnostična laparoskopija

Diagnostična laparoskopija je primarna metoda za diagnosticiranje endometrioze. Laparoskopiska odkritja so raznolika in vključujejo diskretne endometrijske lezije, endometriome in površinske formacije.

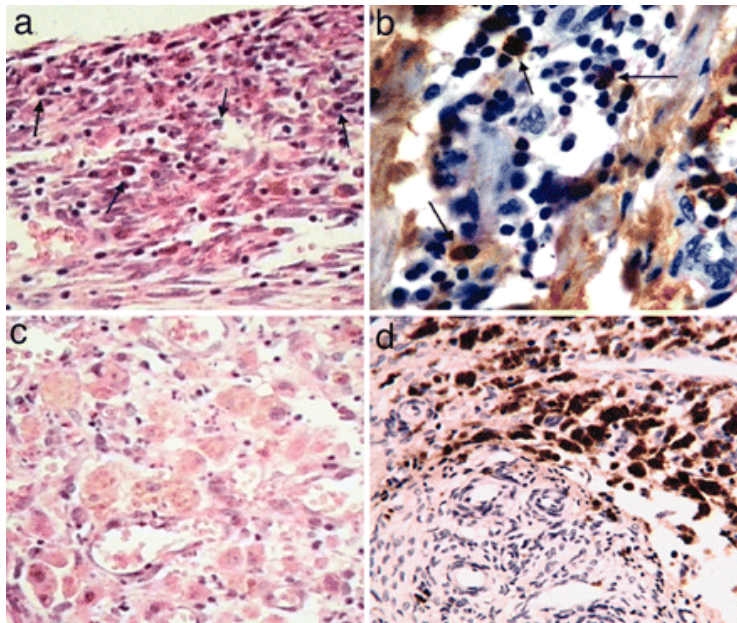


Slika 14: Diagnostična laparoskopija

1.10.4. PATOLOŠKA ANALIZA

Čeprav histološka ocena pri endometriozii ni nujna, nekateri predvidevajo, da samo z laparoskopijo lahko ocenimo za endometriozo tudi stanje, ki to ni. Histološka analiza zahteva prisotnost endometrijskih žlez in strome zunaj maternične votline, prav tako so

lahko prisotni hemosiderinski depoziti in fibromuskularna metaplazija. V velikih endometričnih lezijah najdemo določene mikroskopske najdbe. Rdeče lezije so pogosto ožiljene, medtem ko so bele lezije večinoma sestavljene iz fibroznega tkiva in redkih žil.



Slika 15: Histološka slika endometrioze

- Barvanje s H&E, plazemske celice in endometrijske lezije (puščice) (10x povečava)
- Imunohistokemična analiza kaže, da nekatere plazemske celice izločajo IgM (puščice) (40x povečava)
- H&E barvanje razkriva številne makrofage s hemosiderinom v lezijah endometrioze jajčnika (10x povečava)
- Barvanje z anti - CD68 kaže na prisotnost makrofagov v endometrijskih lezijah (40x povečava)

1.11. ZDRAVLJENJE

Zdravljenje endometrioze je odvisno od specifičnih simptomov, resnosti simptomov, lokacije endometrioze, ciljev zdravljenja in želje po ohranjanju plodnosti. Zelo pomembno je razločiti ali zdravimo bolečino ali neplodnost, saj bo zdravljenje različno.

1.11.1. ZDRAVLJENJE SIMPTOMA BOLEČINA

1.11.1.1. Nesteroidne protivnetne zdravilne učinkovine

Te zdravilne učinkovine inhibirajo ciklooksigenazne encime 1 in 2. Znotraj te skupine selektivni COX2 inhibitorji selektivno inhibirajo COX2 izoencime. Ti encimi so odgovorni za sintezo prostaglandinov, ki so povezani z bolečino pri endometriozii. Ektopično tkivo

izraža višje nivoje COX2 kot evtopično tkivo. Terapija, ki znižuje te nivoje prostaglandina, igra pomembno vlogo pri manjšanju endometrične bolečine.

1.11.1.2. Kombinirani oralni kontraceptivi

Te zdravilne učinkovine inhibirajo sproščanje gonadotropina in zmanjšajo tok menstruacije, poleg tega imajo tudi značilnosti kontraceptivov, kot so zaviranje ovulacije. Ta zdravila se lahko jemljejo neprekinoma ali pa se jemljejo ciklično z premorom za menstruacijo. Za ženske, ki s cikličnim jemanjem ne zmanjšajo bolečine, se priporoča neprekinjeno jemanje. Nizki odmerki (20µg in manj etinilestradiola) lahko povzročijo večje abnormalne krvavitve.

1.11.1.3. Progestini

Progestini se že dolgo uporabljajo za zdravljenje endometrioze. Znani so kot antagonisti estrogenskih učinkov na endometrij, povzročijo decidualiziacijo endometrija in poznejše atrofije endometrija. Progestine vključimo v zdravljenje na številne načine, med njimi tudi z oralnimi progestini, kot so DMPA, IUD in SPRMs.

1.11.1.4. Selektivni progesteron-receptor modulator

Nova metoda zdravljenja endometrioze je uporaba selektivnih progesteron-receptor modulatorjev. Študija je pokazala, da 6 mesečno oralno jemanje SPRM 50µg dnevno, zmanjša medenične bolečine in obseg endometrioze.

1.11.1.5. Androgeni

Prvi medicinsko odobren androgen uporabljen za zdravljenje endometrioze je sintetični androgen danazol. Prevladujoč mehanizem delovanja je supresija srednjega cikla LH in ustvarjanje anovulacijskega stanja. Danazol zasede mesto na SHBG receptorju, da zveča proste testostेरonske nivoje v serumu in se direktno veže na androgenske in progesteronske receptorje. Kot rezultat danazol ustvari hipoestrogensko, hiperandrogeno stanje, ki inhibira endometrijsko atrofijo in endometrijske lezije.

1.11.1.6. Inhibitorji aromataze

Kot smo že prej omenili, endometrijsko tkivo producira aromatazo, encim, ki je odgovoren za sintezo estrogenov. V endometrijskem tkivu je estrogen lahko produciran lokalno skozi aromatizacijo androgenov. To je lahko razlog za endometriozo pri ženskah v menopavzi. Ženske, zdravljene z inhibitorji aromataze, so občutile občutno zmanjšanje bolečine in zmanjšanje endometričnih lezij po 9 mesecih zdravljenja (4).

1.12. KIRURŠKO ZDRAVLJENJE ENDOMETRIOZE

1.12.1. Konservativne operacije

Laparoskopske operacije s tehnikami, kot so abdominalni laser, so postale standard za kirurško obvladovanje endometrioze. Zdaj je veliko varneje in enostavneje odstraniti vidne endometrične lezije z diatermijo (diathermy), CO₂ ali KTP laserji. Endometrična cista je lahko drenirana in odprta, notranja stena ciste pa uničena in vaporizirana z laserom. V nekaterih primerih je potrebna odprta operacija. Konservativne metode so zmanjšale potrebo po odprtih operacijah, pri katerih je čas okrevanja daljši in dovoljuje pacientkam, da odložijo zdravljenje, dokler niso potrebne definitivne metode zdravljenja.

1.12.2. Definitivne metode zdravljenja

Resni simptomi in napredujoča bolezen pri ženskah, ki imajo otroke zahteva definitivno kirurgijo za lajšanje simptomov (dismenoreja in bolečina). Definitivna kirurgija je v obliki histerektomije in bilateralne salpingo-oforektomije. Odstranitev jajčnikov in posledično hormonov jajčnika je dolgoročno in blagodejno v smislu lajšanja simptomov ter za zmanjšanje tveganja ponovitve endometrioze. Definitivna kirurgija je prav tako potrebna pri velikih adherentnih endometričnih cistah in pri majhnem odstotku pacientov z globoko infiltrivno endometriozo na črevesju in mehurju (5).

1.13. TUMORSKI OZNAČEVALCI

Tumorski označevalci so produkti malignih celic ali snovi, ki so nastale v drugih celicah pod vplivom delovanja malignih celic. Določamo jih v telesnih tekočinah, najpogosteje v serumu ali plazmi. Tumorski označevalci so lahko nosintetizirane snovi, kakršnih v zdravem organizmu ne najdemo ali snovi, ki so v zdravem organizmu prisotne, vendar v veliko manjših koncentracijah. Določanje tumorskih označevalcev nam lahko pomaga pri diagnozi bolezni, napovedovanju njenega poteka, pri določanju stadija bolezni, izbiri načina zdravljenja, zgodnjem odkrivanju ponovitve in razširitve bolezni. Tumorski označevalci so zaradi svoje nizke specifičnosti za tkivo, organ, vrsto rakave bolezni in slabih napovednih lastnosti manj primerni za odkrivanje primarnih rakavih obolenj in jih le redko uporabljamo kot presejalno metodo. Vseh tumorskih označevalcev ne uporabljamo z istim namenom. Nekateri so primernejši za spremljanje diagnostike bolezni, drugi za zgodnje odkrivanje bolezni (8). Tumorski označevalci nam lahko služijo tudi kot

napovedni dejavnik. Spremljanje maligne bolezni pred, med in po zdravljenju nam lahko pove veliko o naravi maligne bolezni in s tem o prognozi bolnika (9).

13.1. SPREMEMBA KONCENTRACIJE TO

Sprememba koncentracije tumorskih označevalcev je odvisna od številnih dejavnikov:

- števila celic, ki proizvajajo tumorske označevalce, velikosti tumorja, njegove razširjenosti, stadija
- hitrosti sinteze TO
- hitrosti sproščanja TO iz tumorskih celic ali celičnih površin
- stopnje izražanja tumorskih označevalcev (če posamezen tumor ne izraža TO ne more priti do njegovega povišanja)
- tipa tumorja (tumorske celice lahko izražajo TO, vendar ni nujno da se le ta izloča v telesne tekočine)
- prekrvavljenost tumorja (pri slabi oskrbi tumorja s krvjo pride v krvni obtok manjši delež TO)
- stopnje nekroze tumorskega tkiva (obsežna liza celic povzroči povišanje ravni TO)
- razpolovnega časa TO
- vpliva protiteles (lahko nastanejo imunski kompleksi in hitrost izločanja je nato odvisna od velikosti kompleksov) (8)

13.2. DOLOČANJE TO

TO imajo v telesnih tekočinah nizke koncentracije in za njihovo določanje potrebujemo visoko senzitivno tehnologijo. Tehnike, ki so danes v uporabi, temeljijo na podobnem principu, to je določanju kompleksov antigena in protiteles. Najbolj razširjene metode so radioimunska metoda, encimskoimunska in luminimetrično – imunska metoda. Med seboj se razlikujejo po spojini, ki je vezana na detekcijska protitelesa in po načinu detekcije nastalih kompleksov. Vse našteje metode so prilagojene dokazovanju izredno nizkih koncentracij antigena, tako da velikih razlik v njihovi senzitivnosti ni. Specifičnost metod je v veliki meri odvisna od kvalitete protiteles in specifičnosti protiteles za posamezen antigen oz. TO (9). Uporaba preizkusov različnih proizvajalcev, pa čeprav gre za enako metodo in vključuje enaka protitelesa, daje pri istemu vzorcu različne rezultate. Zato mora biti pri vsakem rezultatu posebej navedena tudi uporabljena metoda. Za lažjo interpretacijo

rezultatov je treba narediti več določitev TO v različnih stadijih bolezni ter spremljati njihovo gibanje koncentracij (8).

13.2.1. Radioimunska tehnika (RIA)

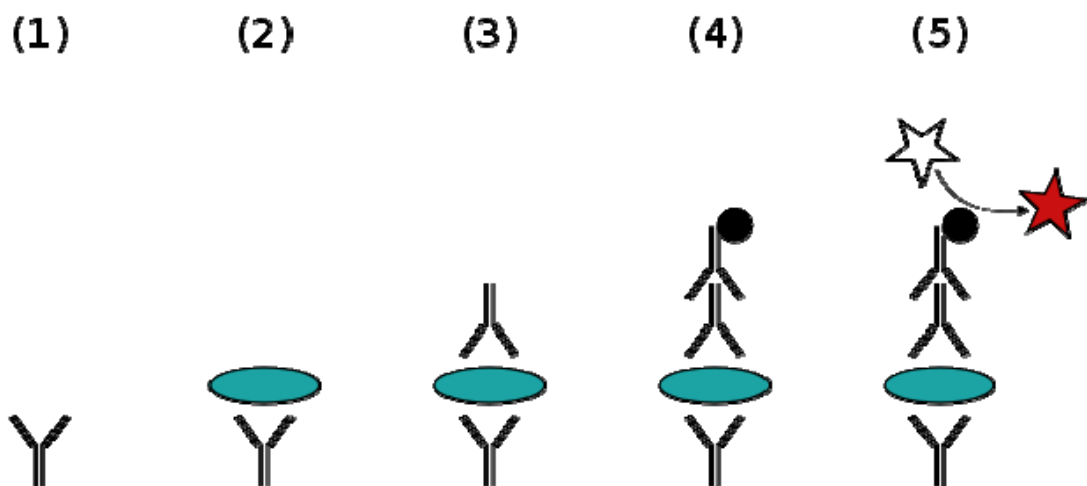
Radioimunski test je eden najboljčutljivejših testov za merjenje antigenov in haptenov. Izmerimo lahko izredno majhne količine (do 10^{-12} g), zaradi česa je metoda primerna za kvantitativno določanje hormonov, serumskih proteinov, zdravil in vitaminov. Uporabljamo radioaktivno zaznamovane antigene, protitelesa ali haptene. RIA v tekoči obliki temelji na tekmovanju med zaznamovanim in nezaznamovanim antigenom za omejeno količino močno afinitetnih protiteles. Naraščajoče koncentracije nezaznamovanega antigena izrinejo vse več zaznamovanega antigena z vezišč. Z merjenjem količine prostega zaznamovanega antigena v raztopini lahko določimo koncentracijo nezaznamovanega antigena.

Ena pomembnejših stopenj je ločitev vezanega antigena od nevezanega (prostega) antigena. Razvili so več metod imenovanih trdne faze RIA, s katerimi je ločevanje kompleksov Ag – Pt od nevezanega antigena lažje.

13.2.2. Encimskoimunska metoda (EIA)

Osnova encimskoimunskih tehnik je pritrnitev različnih encimov na protitelesa ali antigene, tako da se reaktivnost encimov in protiteles ne spremeni. Rezultate lahko zagotovimo s prostim očesom ali s spektrofotmetrom. Zaznamovani encimi so AF, glikoza – 6 – P – dehidrogenaza, peroksidaza. Njihovi substrati so lahko kromogeni, fluorogeni in luminiscenčne spojine. Glede na to ali je zaznamovan antigen ali protitelo ločimo 2 metodi.

ELISA je imunoencimometrična metoda, kjer je z encimom zaznamovano protitelo. ELISA je imunoabsorpcijski test, heterogena metoda podobna RIA, le da je protitelo označeno z encimom. Encim, konjugiran z protitelesom, reagira z brezbarvnim substratom v obarvan produkt. Pri ELISA je ligand antigen ali protitelo označeno z encimom. Ko protitelesa vežemo na trdno fazo, se antigen iz vzorca veže na primarna protitelesa (Pt1). Antigen, ki se ne veže, speremo s pufrom. V naslednjem koraku dodamo z encimom zaznamovano sekundarno protitelo, ki tvori sendvič komplekse s prej nastalimi kompleksi Ag – Pt1. Nevezan prebitek zaznamovanega sekundarnega protitelesa speremo s pufrom in dodamo substrat za encim. Merimo barvo oz. določimo aktivnost encima, ki je obratno sorazmerna koncentraciji antigena.



Slika 16: Direktna ELISA

Če določamo protitelesa, je postopek obraten: antigen je vezan, dodamo specifična protitelesa ter z encimom konjugirana protitelesa in substrat.

13.2.3. Luminimetrične – imunološke metode (lia)

LIA so kompetitivne metode, pri katerih je antigen zaznamovan (npr. z luminolom). Po imunokemični reakciji antigena s protitelesi dodamo reagent, ki vsebuje H_2O_2 in encim peroksidazo. Peroksidaza pretvori vodikov peroksid v vodo in povzroči oksidacijo luminola ter s tem spravi luminol v stanje povečane energije. Preko intermediatov luminol prehaja nazaj v osnovno stanje, pri čemer oddaja luminiscenco. V reakciji se sprošča svetlobna energija, ki jo merimo pri 425 nm. Poleg luminola se lahko uporabljata še izoluminol in luciferin. V bistvu merimo kemiluminiscenco oz. bioluminiscenco.

Tumorske označevalce določamo:

- pred operativnim posegom, pred kakršnim koli drugim zdravljenjem (obsevanje, kemoterapija, hormonsko ali biološko terapijo)
- po operativnem posegu, med zdravljenjem in po končanem zdravljenju (enkrat na - 3–6 mesecev do drugega leta, kasneje enkrat na leto oz. ob rednih pregledih)
- ob sumu na ponovitev ali napredovanje bolezni
- pred spremembo terapije
- najmanj 3 tedne po začetku nove terapije
- 2–3 tedne po določitvi povečanih koncentracij TO

Potrebe v praksi so velikokrat drugačne, zato je treba dinamiko določanja prilagoditi.

13.3. SENZITIVNOST IN SPECIFIČNOST TUMORSKIH OZNAČEVALCEV

- vsak označevalac naj bi bil značilen za organ in tumor
- označevalac naj bi tvorila samo maligna tumorska tkiva
- označevalac naj bi bil dokazljiv pri vseh bolnikih z istovrstnim tumorjem
- tvoril naj bi se v zadostnih količinah, ki bi jih lahko zaznali že na začetni stopnji razvoja malignega tumorja
- serumske koncentracije naj bi odražale velikost tumorske mase (9)

Še dandanes ne poznamo antigenske strukture, ki bi obstajala samo v malignih tumorskih celicah, kar pomeni, da lahko protitelesa navzkrižno reagirajo tudi z drugimi antigenskimi strukturami, kar moramo vedno imeti v mislih pri vrednotenju rezultatov (9).

Vlogo in vrednost posameznega TO ter metode za določeno vrsto rakave bolezni natančno opredelimo s pojmom občutljivost in specifičnost.

Občutljivost TO pove, pri kolikšnem deležu bolnikov z nekim tumorjem je raven označevalca povišana. Čim večji je delež bolnikov z istovrstnim tumorjem, pri katerih je delež TO povišan, tem bolj občutljiv je označevalac. Pri takem označevalcu pričakujemo majhno število lažno negativnih določitev.

Specifičnost predstavlja delež preiskovancev, ki nimajo rakavega obolenja in imajo normalno koncentracijo TO. To pomeni, da je TO tem bolj specifičen, čim manj krat je prisoten pri ljudeh brez tumorja. Pri takem TO pričakujemo čim manj lažno pozitivnih določitev. Idealen TO naj bi imel 100 odstotno občutljivost in referenčno vrednost 0 (8).

TO lahko uporabljamo za dokazovanje malignega procesa na splošno, kar pomeni, da nas ne zanima za katero vrsto raka gre, ampak nas zanima le potrditev, da pri bolniku obstaja maligna bolezen. V takšnih primerih nas zanima občutljivost detekcije, manj pa njena specifičnost. Takrat se odločimo za kombinacijo čim več označevalcev s čim manj lažno negativnimi določitvami (9).

13.4. POMANJKLJIVOSTI TUMORSKIH OZNAČEVALCEV

- nezadostna specifičnost za določeno vrsto rakave bolezni
- tvorba TO v velikih koncentracijah pri ne rakavih procesih (vnetja, benigni tumorji, bolezni jeter, trebušne slinavke...)
- tvorba pri različnih fizioloških stanjih (nosečnost, menstruacija, laktacija...)

- tvorba v povsem zdravih tkivih

13.5. DELITEV TUMORSKIH OZNAČEVALCEV

Delitev po biokemičnih lastnostih, mestu nastanka in funkcionalnosti:

- onkofetalni proteini
- hormoni in/ali karcinoplacentarni proteini
- encimi
- tumor spremljajoči antigeni
- posebni serumski proteini
- mešani označevalci

Delitev glede na mesto določitve:

- humoralni tumorski označevalci (kri, telesne tekočine)
- celični tumorski označevalci (v celicah ali na površini celic) (8)

13.5.1. Onkofetalni proteini

Onkofekalni proteini so antigeni, ki normalno nastajajo med embrionalnim razvojem. Pri odraslih je njihova tvorba omejena ali ustavljena. Povečane koncentracije teh antigenov pri odraslih so posledica ponovne aktivacije nekaterih genov, ki nadzorjujejo rast celic in so neposredno v povezavi z malignim procesom. Tipična predstavnika sta CEA in AFP.

CEA je značilen predstavnik te skupine. Je glikoprotein. Med embrionalnim razvojem nastaja v epiteljskih celicah gastrointestinalnega trakta, jeter in trebušne slinavke. CEA je prisoten tudi v nekaterih normalnih tkivih odraslih kot so črevesna sluznica, rebna mrena in bolezensko spremenjenih tkivih nemalignega izvora ter v tkivu raka širokega črevesa in drugih malignih tumorjih. Povišane serumske koncentracije CEA lahko razen pri zgoraj naštetih stanjih in tkivih zasledimo tudi pri hudih kadilcih, pri bolnikih z bronhitisom, gastritisom, duodenalnim ulkusom, jetrnimi okvarami, pankreatitisom in drugim. CEA je kljub pomanjkljivostim pomemben označevalec za spremljanje bolnikov z rakom širokega črevesa in danke, saj ima 65% vseh bolnikov s to boleznijo (vključujoč tudi tiste z lokalizirano boleznijo in stadijem I) in celo 100% bolnikov z metastatsko razširjeno boleznijo povišane serumske koncentracije tega označevalca. V rangu 4-10 ng/ml najdemo bolnike z tako malignimi kot benignimi boleznimi in celo težke kadilce, medtem ko so serumske koncentracije CEA nad 10 ng/ml bolj pokazatelj malignega procesa.

AFP je glikoprotein, ki med embrionalnim razvojem nastaja v rumenjaku vrečki, celicah gastrointestinalnega trakta in jeter. Med nosečnostjo AFP prehaja v amnijsko tekočino

preko plodove krvi in preko placente v materino kri. Pri nosečnicah so serumske koncentracije odvisne od trajanja nosečnosti, lahko so pa tudi indikator za različne anomalije ploda. Pri odraslih osebah je APF prisoten v krvi v izredno majhnih količinah. Normalne vrednosti v serumu se vzpostavijo približno 9 mesecev po rojstvu. Povišane serumske koncentracije nad 10 ng/ml pri odraslih zasledimo pri cirozi jeter, akutnem virusnem hepatitisu, obstruktivnem ikterusu in nekaterih malignih boleznih kot so rak trebušne slinavke, pljuč in želodca. Poseben pomen ima za spremljanje bolnikov s hepatocelularnim karcinomom (95 do 100% specifičnost in senzitivnost), kjer so koncentracije nad 1200 ng/ml potrditev hepatocelularnega karcinoma.

13.5.2. Hormoni

Maligne tvorbe lahko spremenijo potek v sintezi in izločanju hormonov. Kvalitativne in kvantitativne spremembe v sintezi in izločanju so lahko pokazatelj malignega procesa in jih spremljamo kot TO. Tumorji se lahko razvijejo v endokrinih žlezah, kjer se zaradi maligne produkcije zviša ali zniža produkcija hormona. V to skupino uvrščamo hormone, kot so parathormon, insulin, prolaktin, kateholamini in drugi. Druga možnost je, da maligno spremenjene celice nekaterih organov začnejo tvoriti hormone–ektopična tvorba hormonov. Ti hormoni so kalcitonin in parathormon pri raku dojke, lipotropin pri kacinoidnih tumorjih, kalcitonin, inuslin, parathormon pri malignomih timusa).

βHCG spada v posebno skupino karcinoplacentarnih antigenov, ki nastajajo v placenti med nosečnostjo in so pri odraslih prisotni le izjemoma. Povečane serumske koncentracije lahko zasledimo pri skoraj vseh bolnicah z geminalnimi tumorji. Zaradi kratkega razpolovnega časa (36-48 ur) je uporaben za spremljanje zdravljenja in za prognozo. Rahlo povišane vrednosti zasledimo pri bolnikih z rakom dojke, želodca, pljuč, jeter ali širokega črevesa kjer za spremljanje v klinični praksi niso pomembne.

13.5.3. Encimi

TO so lahko tudi nekateri encimi, katerih povečana tvorba nakazuje na rakav proces v telesu.

PKF normalno nastaja v prostati. Povišane serumske koncentracije nad 3 ng/ml zasledimo pri bolnikih z rakom na prostati in to običajno pomeni napredovano fazo bolezni. Določanje je primerno za razlikovanje benignih od malignih procesov. Pomembno je, da kri odvezamemo pred ali 48 ur po kakršnemkoli fizičnem pregledu prostate ali rektalnem pregledu, saj se po tem pregledu serumske koncentracije povečajo tudi do 5 krat.

AF obstaja kot vrsta izoenzimov, ki nastajajo v jetrih, kosteh ali placenti. Povišanje serumske koncentracije pri bolnikih z maligno boleznijo ponavadi pomeni metastatsko razširitev bolezni v jetra in/ali kosti ali prisotnost osteosarkoma.

NSE je citoplazemski glikolitičen encim, ki so ga primarno dokazali v celicah neuroektodermalnega izvora in v nevronih. Pozneje so ugotovili, da je prisoten tudi v tumorskem tkivu tumorjev z neuroektodermalno ali neuroendokrino diferenciacijo. Povečana tvorba nad 15 ng/ml je lahko povezana z nastankom nevroblastoma, drobnoceličnega pljučnega raka ali medularnega dela ščitnice. V to skupino spadajo še LDH, GGT in TK, ki so nespecifični.

13.5.4. Tumor spremljajoči antigeni

So heterogena skupina označevalcev, ki zajema različne membranske strukture specifičnih tumorskih celic. Sodobna tehnologija izkorišča možnost tvorbe specifičnih monoklonskih protiteles proti določeni antigenski strukturi. Označevalci v tej skupini so bolj specifični za določeno vrsto malignega tumorja kot ostali in pogosto njihove serumske koncentracije bolj natančno odražajo rast ali zmanjševanje tumorske mase.

CA 15-3 je ogljikohidratni antigen, ki nastaja v sekretornem epiteliju dojke, pljuč, gastrointestinalnih organov, maternice in je pogosto v izločkih zdravih odraslih oseb. Zvišane koncentracije nad 30 kU/L zasledimo predvsem pri bolnicah z rakom dojke. Koncentracije so lahko zvišane tudi pri drugih malignih boleznih, kot je rak pljuč, prostate, jajčnikov, materničnega vratu in pri malignih tumorjih gastrointestinalnega trakta. CA 15-3 je lahko povišan tudi pri benignih tvorbah v dojki, vendar koncentracije ne presežejo 40 kU/L. poviša se lahko tudi med 38. in 40. tednom nosečnosti.

MCA je označevalec, ki nastaja v normalnem epiteliju dojke, ledvic, endometrija, uretre in prostate. Značilen je za raka dojke. Ima 80% specifičnost in 70% senzitivnost za raka dojke z mucinsko komponento. Povišan je lahko tudi pri bolnikih z drugimi malignimi tumorji epiteljskega izvora. MCA je dober označevalec za zgodnje odkrivanje ponovitve bolezni in spremljanje dinamike ter odgovora na zdravljenje bolezni raka dojke. Serumske koncentracije MCA so povišane pri 57,2% nosečnic, v tretjem trimesečju pa lahko celo v 100%.

Karcinomski antigen 125 (CA 125) je značilen označevalec raka jajčnikov. Je glikoprotein z molekulska maso okrog 200 kD in nastaja pri več kot 80% bolnic z nemucinoznim rakom jajčnikov. Med embrionalnim razvojem CA 125 nastaja v celomskem epiteliju, Müllerjevih vodih, epitelnih celicah plevre, perikarda in peritoneja.

Pri odraslih je CA 125 prisoten v sluznici materničnega vratu in pljučnem parenhimu. Zanimivo je, da ne nastaja v zdravem tkivu jajčnikov. Povišane serumske koncentracije (35 kU/l) najdemo, razen pri bolnicah z rakom jajčnikov, še pri bolnicah z benignimi in malignimi ginekološkimi obolenji, kot so endometrioza, ciste na jajčnikih, rak endometrija, rak materničnega vratu, kot tudi pri nekaterih bolnikih z ne ginekološkimi malignimi obolenji, kot so rak pljuč, rak prostate in maligni mezoteliom peritoneja (8). TO CA 125 se nespecifično zviša tudi pri fizioloških procesih, kot je menstruacija in med nosečnostjo posebej v zadnjem tromesečju. 95% zdrave populacije ima CA 125 < 35 kU/L. Razpolovni čas CA 125 je 2 – 6 dni

Spremljamo ga pooperativno za ugotavljanje ostankov tumorske mase. Med zdravljenjem za spremljanje odziva na zdravljenje in za zgodnje odkrivanje ponovitve bolezni. Povišane koncentracije CA 125 za 50% je pri bolnicah z ovarijskim karcinomom lahko zaznavno že nekaj mesecev pred kliničnimi znaki ponovitve bolezni (10).

PSA je protein, ki je prisoten v tkivu prostate in semenski tekočini, kjer doseže izredno visoke koncentracije. Pri zdravem moškem prisoten v krvi v zanemarljivih količinah, pri raku prostate se koncentracije v serumu povečajo nad 10 ng/ml. Tudi za PSA velja enako pravilo odvzema, kot za določanje KPF, ki določa, da koncentracija v krvi naraste zaradi fizičnega pregleda prostate in je treba kri odvzeti pred ali vsaj 48 ur po pregledu prostate ali rektalnem pregledu.

13.5.5. Posebni serumski proteini

TG je intracelularni glikoprotein, ki je odgovoren za nastanek in shranjevanje tiroksina. V nizkih koncentracijah je normalno prisoten v serumu, medtem ko se v visokih koncentracijah pojavlja pri bolnikih z dobro definiranim folikularnim rakom ščitnice.

Beta – 2 mikroglobulin je protein prisoten na celični membrani skoraj vseh diferenciranih celic. V nizkih količinah ga zasledimo v vseh telesnih tekočinah. Povišane serumske koncentracije lahko izmerimo pri bolnikih z rakom pljuč, dojk, trebušne slinavke, debelega črevesja in danke ter z limfomi ter kronično limfocitno levkemijo.

S-100 protein je prisoten v različnih zdravih tkivih. Normalne koncentracije označevalca v serumu so 0.3 ng/ml. S-100 protein je dober kazatelj poškodb v osrednjem živčnem sistemu. Uporablja se tudi kot TO pri bolnikih z nevrinomom, glioblastomom, astroцитomom in meningeomom. Posebno vlogo naj bi imel kot napovedni dejavnik pri malignem malignomu.

13.5.6. Skupina različnih serumskih označevalcev

Skupina zajema označevalce, katerih tvorba izredno dobro spremlja spremembe v hitrosti celične proliferacije. Niso specifični za določene tumorje, ampak na splošno nakazujejo na možnost obstoja maligne bolezni (9).

2. NAMEN DELA

Karcinomski antigen 125 (CA 125) je značilen označevalec raka jajčnikov. Pri odraslih je CA 125 fiziološko prisoten v sluznici materničnega vratu in pljučnem parenhimu. Povišane serumske koncentracije nad 35 kU/L najdemo, razen pri bolnicah z rakom jajčnikov, še pri bolnicah z benignimi in malignimi ginekološkimi obolenji kot so endometrioza, ciste na jajčnikih, rak endometrija, rak materničnega vratu, kot tudi pri nekaterih bolnikih z ne-ginekološkimi malignimi obolenji, kot so rak pljuč, rak prostate in maligni mezoteliom peritoneja. TO CA 125 se nespecifično zviša tudi pri fizioloških procesih, kot je menstruacija in med nosečnostjo.

V raziskavo smo vključili dve skupini bolnic z Ginekološke klinike UKC Ljubljana, katerih vzorci so bili analizirani na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo. Prva skupina 25 bolnic z endometrioza, katerim je bil TO CA 125 izmerjen med letoma 2008 in 2009 ter druga skupina brez endometrioze, ki je služila kot kontrolna skupina. Sestavljena je bila iz 94 bolnic, katerim je bil TO CA 125 izmerjen v letu 2011.

V diplomski nalogi bomo statistično ovrednotili rezultate meritev koncentracije CA 125 z namenom:

- da, ugotovimo ali je določitev tumorskega označevalca CA 125 pri bolnicah z endometrioza klinično pomemben parameter ali ne
- da, ugotovimo s kakšno specifičnostjo in občutljivostjo lahko določimo povišan rezultat tumorskega označevalca CA 125

3. EKSPERIMENTALNI DEL

3.1. Opis bolnic

Analizirali smo dve skupini vzorcev. Obe skupini sta bili sestavljeni iz predstavnic ženskega spola. Prva skupina ($n_1 = 25$) so bile ženske z endometriozo, s povprečno starostjo 37 let. Od tega je bila najmlajša preiskovanka stara 25, najstarejša pa 55 let. Druga skupina ($n_2 = 94$) je bila kontrolna skupina, v kateri so bili vzorci žensk brez endometrioz. Povprečna starost žensk v kontrolni skupini je bila 49 let. Najmlajša je bila stara 15, najstarejša pa 85 let. Vzorci prve skupine so bili odvzeti med letoma 2008 in 2009, vzorci druge skupine pa 2011 na SPS Ginekološki kliniki v Kliničnem centru Ljubljana. Analiza je bila opravljena na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo.

3.2. Imunska metoda s kemiluminiscenco

Je in vitro test za kvantitativno detekcijo CA 125IITM antigena v človeškem serumu, EDTA ali heparinizirani plazmi pri bolnikih z primarnim invazivnim rakom jajčnika. Analiza mora biti opravljena na LIAISON analizatorju.

3.3. Vzorci

Vzorec je lahko serum ali plazma (EDTA, heparin). Za 24 ur ga lahko hranimo v hladilniku pri 2–8 ° C. Pomembno je, da v primeru, da vzorec ni analiziran na dan odvzema, ločimo serum od sedimenta in serum shranimo na –20 ° C. Izogniti se moramo večkratnemu zmrzovanju in odtaljevanju vzorca. Shranjene vzorce pred analizo temeljito premešamo na Vortex napravi. Hemolizirani, lipemični, koagulirani in vzorci, ki vsebujejo bakterije, niso primerni za analizo. Minimalni volumen za posamezno detekcijo je 250 µL vzorca (100 µL vzorca in 150 µL mrtvega volumna).

3.4. Razlaga testa

Dve antigenski determinanti definirani z monoklonskima protitelesoma OC 125 in M11 najdemo na heterogeni skupini visokomolekularnih (200000–1000000) glikoproteinov.

Te glikoproteine lahko v visokem procentu detektiramo pri nemukoznih epitelijskih tumorjih jajčnika. Najdemo jih lahko tudi v nekaterih tkivih zarodka in pri odraslih v epiteliju jajcevoda, endometriju, materničnem vratu, žlezah dojk in žlezah znojnicah.

Zvišane testne vrednosti CA 125IITM v serumu večinoma najdemo pri pacientkah z aktivnim epitelijskim rakom jajčnika v zgodnji fazi bolezni. Rezultate lahko uporabimo tudi za terapevtsko spremljanje teh bolnikov.

3.5. Princip metode

Trdna faza je prevlečena (magnetni delci) z dvema visoko specifičnima monoklonalnima mišjima protitelesoma (MPt M 11/MPt OC 125), na katera se veže antigenska struktura CA 125. Monoklonska mišja protitelesa so uporabljena tudi kot sledilo.

Med prvo inkubacijo se CA 125IITM prisoten v kalibratorju, vzorcu ali v kontroli, veže na monoklonska mišja protitelesa (M 11) na trdni fazi, sledi spiranje in druga inkubacija, med katero konjugirana mišja protitelesa (OC 125 označena z luminolom) reagirajo z CA 125IITM, ki je že vezan na trdno fazo. Po inkubaciji sledi spiralni cikel, kjer se nevezan material spere.

V naslednjem koraku so dodani startni reagenti in kemiluminiscenčna reakcija je inducirana. Svetlobni signal in s tem količina luminol – protitelo konjugata je merjena s fotopomnoževalkami kot relativna svetlobna enota in kaže CA 125IITM koncentracijo prisotno v kalibratorju, vzorcu ali kontroli.

3.6. Material

3.6.1. Reagenčni material za 100 določitev

- 2,3 ml suspenzije magnetnih delcev: magnetni delci prevlečeni z M11, monoklonska mišja protitelesa
- 1,0 ml kalibrator z nizko koncentracijo M11
- 1,0 ml kalibrator z visoko koncentracijo M11
- 23 ml sledilna konjugirana raztopina: OC 125 sledilo, označeno z isoluminolom, monoklonska mišja protitelesa
- 13 ml pufra
- 25 ml razredčilne tekočine - diluent

3.6.2. Priprava reagentov

Pred odprtjem posodic z reagenti smo le te previdno in rahlo pretresli, da smo se izognili penjenju reagentov. Vsebino posode z reagentom, ki je vsebovala magnetne delce smo resuspendirali z obračanjem zobatega kolesa na embalaži dokler se suspenzija ni obarvala rjavo. Previdno smo obrisali površino in odstranili preostalo tekočino. Reagent smo postavili v prostor na analizatorju tako, da je črna koda na levi strani. Pred uporabo reagent pustimo stati pol ure. Analizator samodejno premeša in popolnoma resuspendira magnetne delce.

3.7. Kalibracija

Kalibracijo izvajamo:

- Ob uporabi novega reagenta
- Če sta od prejšnje kalibracije minila 2 tedna
- Ob servisu analizatorja
- Kadar so vrednosti kontrole izven dovoljenega območja
- Ob spremembi temperature prostora za 5 °C

3.8. Postopek

Postopek je avtomatiziran:

- 100 µL vzorca, kalibratorja ali kontrole
- +100 µL pufra
- +20 µL prevlečenih magnetnih delcev
- 10 min inkubacija kateri sledi spiranje
- +200 µL konjugata sledila
- 10 min inkubacija, kateri sledi spiranje
- 3 s merjenje rezultata

3.9. Kontrola kakovosti

- Vsaj enkrat na dan uporabe
- Ob uporabi novega reagenta
- Ob kalibraciji startnih reagentov
- Dva tedna po odprtju reagentov

3.10. Izračun rezultatov

Analizator samodejno pretvori rezultate v kU/L

3.11. Območje meritve

LIAISON[®] sistem lahko zazna vrednosti TO CA 125 med 0.2 in 1000 kU/L.

3.12. Referenčno območje

Je definirano kot niz vrednosti v katerega spada 95% normalne populacije. Pri določanju referenčnih vrednosti TO CA 125 je manj kot 5% od 100 preverjenih na videz zdravih darovalcev krvi (50 moških, 50 žensk) kazalo vrednosti višje od 35 kU/L (cut off), te vrednosti so odvisne od starosti in od menstruacijskega cikla.

Vsak laboratorij bi moral določiti svoje referenčno območje.

3.13. Interference

Nadzorovane študije kažejo, da možne interference ne vplivajo na rezultat v koncentracijah, ki so manjše od prikazanih v tabeli:

Tabela II: Interference

Interferenca	Koncentracija
Bilirubin	< 0,2 mg/mL
Hemoglobin	< 1000 mg/mL
Trigliceridi	< 12,5 mg/mL

3.14. Natančnost

Različni vzorci, ki vsebujejo različne koncentracije CA125II[™], so bili testirani na ponovljivost in obnovljivost testa.

Tabela III: Natančnost

Intra variabilnost testa			Inter variabilnost testa		
Srednja vrednost (kU/L)	CV (%)	n	Srednja vrednost (kU/L)	CV (%)	n

30,5	1,4	19	33,01	5,8	19
121,1	1,8	20	73,02	4,6	19
730,8	2,2	20	748,74	5,4	19

3.15. Občutljivost

Občutljivost je merilo zmožnosti metode, da razlikuje med majhnimi razlikami v koncentraciji analizirane snovi. Dva faktorja omejujeta občutljivost: naklon (odziv/koncentracija) kalibracijske krivulje ter ponovljivost in natančnost merilne naprave. Izraz občutljivost se uporablja tudi v smislu meje zaznavnosti, ki je definirana je kot najmanjša koncentracija analita, ki jo lahko zaznamo pri znani stopnji zaupanja. LIAISON sistem za analizo TO CA 125 ima mejo zaznavnosti < 0.2 kU/L.

3.16. Omejitve pri metodi

- Reagenti se lahko uporabljajo izključno na LIAISON[®] sistemu.
- Reagenti, ki jim je potekel rok uporabe se ne smejo uporabljati.
- Sledenje navodilom proizvajalca in usposobljen operater LIAISON[®] sistema sta potrebna za pridobitev zanesljivih rezultatov.
- Bakterijska kontaminacija in delovanje toplote na vzorce lahko vpliva na rezultate.
- Pokažejo se lahko vrednosti znotraj referenčnega območja kljub malignemu obolenju in zvišane vrednosti pri pacientih z benignimi boleznimi, kot so perikarditis, huda endometrioza, ciste na jajčnikih, rak maternice, jeter, pljuč ali pankreasa. Zvišane vrednosti se lahko pojavijo tudi pri nosečnosti. Zato se vrednosti testa lahko interpretirajo samo v kontekstu z klinično sliko in drugimi diagnostičnimi postopki.
- Čeprav so dodani nevtralizacijski agenti, ki nevtralizirajo humana protitelesa proti mišjim monoklonskim protitelesom, lahko ekstremno visoke koncentracije humanih protiteles proti mišjim monoklonskim protitelesom vplivajo na rezultat.
- Vzorci z zelo visokimi koncentracijami CA 125 so lahko razredčeni z diluentom.

4. REZULTATI

Tabela IV: Koncentracije CA 125 v skupini z endometriozo in v kontrolni skupini

	Skupina z endometriozo		Kontrolna skupina brez endometrioze	
vzorec	Vrednost S CA 125 (kU/L)	Vrednost CA 125	Vrednost S CA 125 (kU/L)	Vrednost CA 125
1	14,0	Normalna	3,2	Normalna
2	41,4	Zvišana	3,4	Normalna
3	102,9	Zvišana	3,6	Normalna
4	39,3	Zvišana	4,1	Normalna
5	26,0	Normalna	4,2	Normalna
6	49,9	Zvišana	4,3	Normalna
7	20,7	Normalna	4,5	Normalna
8	6,3	Normalna	4,6	Normalna
9	42,2	Zvišana	5,1	Normalna
10	27,5	Normalna	6,1	Normalna
11	37,6	Zvišana	6,3	Normalna
12	19,9	Normalna	6,6	Normalna
13	284,0	Zvišana	6,7	Normalna
14	47,6	Zvišana	6,8	Normalna
15	20,2	Normalna	7,1	Normalna
16	193,5	Zvišana	7,3	Normalna
17	26,0	Normalna	7,3	Normalna
18	27,6	Normalna	7,3	Normalna
19	45,5	Zvišana	7,9	Normalna
20	56,6	Zvišana	8	Normalna
21	15,7	Normalna	8	Normalna
22	21,8	Normalna	8,4	Normalna
23	281,6	Zvišana	8,4	Normalna
24	305,1	Zvišana	8,6	Normalna

25	51,4	Zvišana	8,7	Normalna
26			8,7	Normalna
27			9,1	Normalna
28			9,2	Normalna
29			9,5	Normalna
30			9,5	Normalna
31			10	Normalna
32			10	Normalna
33			10,3	Normalna
34			10,3	Normalna
35			10,4	Normalna
36			10,7	Normalna
37			11,4	Normalna
38			11,9	Normalna
39			12	Normalna
40			12,1	Normalna
41			12,1	Normalna
42			12,1	Normalna
43			12,5	Normalna
44			12,8	Normalna
45			13	Normalna
46			13	Normalna
47			13	Normalna
48			13,1	Normalna
49			13,2	Normalna
50			13,3	Normalna
51			13,5	Normalna
52			15	Normalna
53			15,7	Normalna
54			15,9	Normalna
55			16,3	Normalna
56			16,4	Normalna

57			16,5	Normalna
58			16,6	Normalna
59			16,7	Normalna
60			17	Normalna
61			17,1	Normalna
62			17,8	Normalna
63			18,2	Normalna
64			18,9	Normalna
65			19,4	Normalna
66			19,8	Normalna
67			20,5	Normalna
68			20,6	Normalna
69			22,6	Normalna
70			22,9	Normalna
71			23,1	Normalna
72			23,5	Normalna
73			24,5	Normalna
74			26	Normalna
75			26,4	Normalna
76			26,5	Normalna
77			26,5	Normalna
78			27,2	Normalna
79			27,4	Normalna
80			27,6	Normalna
81			27,7	Normalna
82			29,4	Normalna
83			32,6	Normalna
84			34,2	Normalna
85			34,6	Normalna
86			39,5	Zvišano
87			40,9	Zvišano
88			46,6	Zvišano

89			47,3	Zvišano
90			49	Zvišano
91			64	Zvišano
92			65,3	Zvišano
93			67,7	Zvišano
94			71,3	Zvišano

4.1. Statistična obdelava rezultatov

Preiskovanke smo razdelili v dve skupini. Prva skupina so ženske s potrjeno diagnozo endometrioze med 25 in 55 leti. Druga skupina je kontrolna skupina s preiskovankami brez endometrioze, starosti med 15 in 85 leti. Zanima nas ali se skupini statistično razlikujeta. Za vse teste smo uporabili stopnjo tveganja $\alpha = 0.05$.

S statističnim programom SPSS 17.0 smo preverili ali se izmerjeni rezultati razporejajo po Gaussovi distribuciji (normalno). Uporabili smo Kolmogorov-Smirnov test. Istočasno smo dobili podatke o številu preiskovank (N), povprečni vrednosti izmerjenih rezultatov, standardni odklon ter največjo pozitivno in negativno razliko porazdelitve koncentracij.

Postavili smo si dve hipotezi:

H_0 : vrednosti CA 125 se porazdeljujejo normalno

H_1 : vrednosti CA 125 se ne porazdeljujejo normalno

Če je P vrednost manjša od 0.05, zavrnilo domnevo o normalni porazdelitvi. Če je P vrednost večja od 0.05, ni dovolj dokazov na podlagi katerih bi lahko sklepali, da distribucija ni normalna (smatramo, da je domneva o normalnosti pravilna). V primeru, da je porazdelitev normalna, vzamemo za statistično primerjavo t-test za parametrične porazdelitve. Če porazdelitev ni normalna vzamemo Mann-Whitney neparametričen test.

Statistični podatki prve skupine z endometriozo

Tabela V: Statistični podatki skupine z endometriozo

	N	Povprečna vrednost	Standardna deviacija	Minimum	Maksimum
Endometriozna	25	72,1720	90,14707	6,30	305,10

Statistični podatki prve skupine z endometriozo

Tabela V: Statistični podatki skupine z endometriozo

	N	Povprečna vrednost	Standardna deviacija	Minimum	Maksimum
--	---	--------------------	----------------------	---------	----------

Eno-vzorčni Kolmogorov-Smirnov test

Tabela VI: Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa za skupino z endometriozo

		Endometriozaa
N		25
Normalni parametri	Povprečna vrednost	72,1720
	Std. Deviacija	90,14707
Najbolj ekstremne razlike	Absolutna vrednost	,369
	Pozitivna	,369
	Negativna	-,232
Kolmogorov-Smirnov Z		1,843
P vrednost (dvostranski test)		,002

Z rezultatov Kolmogorov-Smirnov testa za skupino z endometriozo lahko trdimo, da rezultati ne sledijo normalni porazdelitvi, saj je bila izračunana stopnja značilnosti, ki je nižja od 0.05.

$$P_{\text{izračunana}} = 0.002 < 0.05$$

Statistični podatki druge kontrolne skupine brez endometriozie

Tabela VII: Statistični podatki kontrolne skupine

	N	Povprečna vrednost	Standardna deviacija	Minimum	Maksimum
kontrola	94	18,1479	14,55901	3,20	71,30

Eno – vzorčni Kolmogorov – Smirnov test

Tabela VIII: Kolmogorov - Smirnov test za kontrolno skupino

		Kontrola
N		94
Normalni Parametri	Povprečna vrednost	18,1479
	Std. Deviacija	14,55901
Najbolj ekstremne razlike	Absolutna vrednost	,178
	Pozitivna	,178
	Negativna	-,152
Kolmogorov-Smirnov Z		1,722
P vrednost (dvostranski test)		,005

Z rezultatov Kolmogorov-Smirnov testa za kontrolno skupino brez endometriozii lahko trdimo, da rezultati ne sledijo normalni porazdelitvi, saj je bila izračunana stopnja značilnosti, ki je nižja od 0.05.

$$P_{\text{izračunana}} = 0.005 < 0.05$$

Zaradi nenormalne porazdelitve rezultatov pri skupini z endometriozii in pri kontrolni skupini, smo se za nadaljnjo statistično primerjavo odločili za Mann – Whitney test za neparametrične porazdelitve.

Tabela IX: Izračun rangov

skupina	N	Povprečna vrednost rangov	Seštevek rangov
Skupina endometriozii	25	90,90	2272,50

Kontrolna skupina brez endometrioze	94	51,78	4867,50
Skupaj	119		

Testna statistika

Tabela X: Izračuni Mann -
Whitney testa

	Vrednosti CA 125
Mann-Whitney U	402,500
Z	5,039
P vrednost	,000

Izračunali smo Mann-Whitney neparametričen test s pomočjo statističnega programa SPSS 17.0. Prva tabela kaže, da je rang povprečnih vrednosti pri skupini z endometriozo višji kot pri kontrolni skupini brez endometrioze. Postavili smo si dve hipotezi:

H_0 : skupini se med seboj statistično ne razlikujeta

H_1 : prva skupina z endometriozo ima višje vrednosti, kot druga kontrolna skupina, skupini se med seboj statistično razlikujeta

$P_{\text{izračunana}} = 0.00 < 0.05$ potrjuje H_1 hipotezo, ki trdi, da se skupini statistično razlikujeta.

4.2. Specifičnost in občutljivost

Tabela XI: Občutljivost in specifičnost

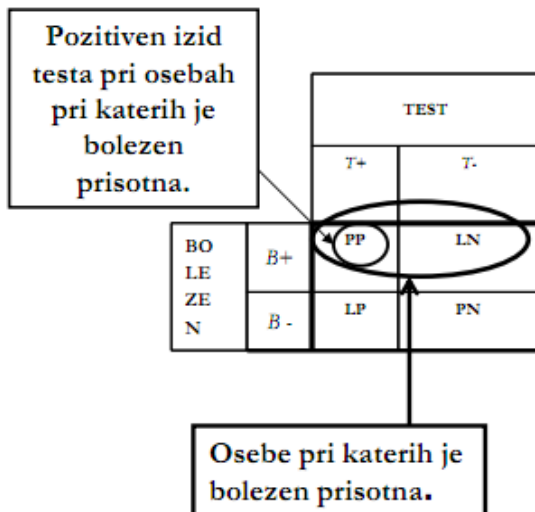
	Povišane vrednosti tumorskega označevalca CA 125	Normalne vrednosti tumorskega označevalca CA 125
Število bolnikov z endometriozo	PP=14	LN=11
Število oseb brez endometrioze	LP=9	PN=85

PP : pravilno pozitiven rezultat

LP : lažno pozitiven rezultat

PN : pravilno negativen rezultat

LN : lažno negativen rezultat



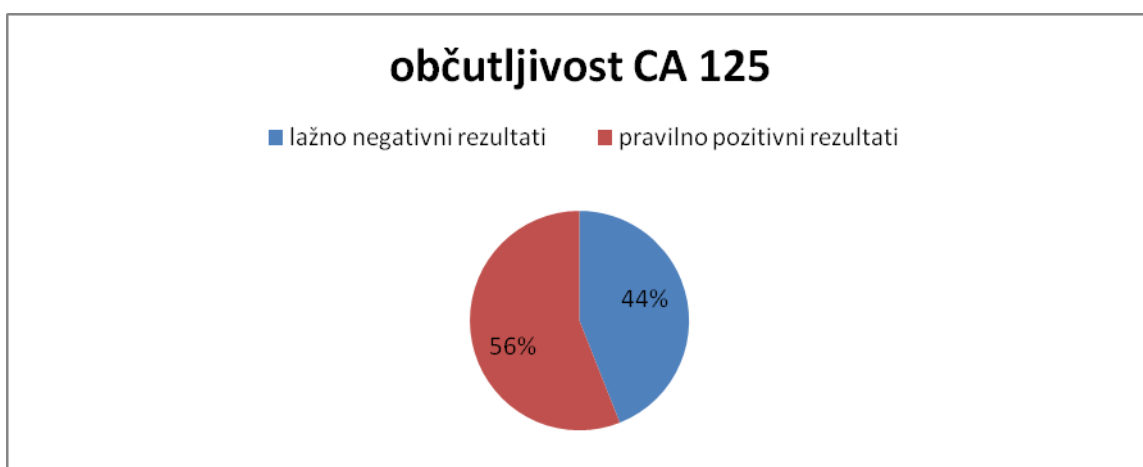
Slika 17: Občutljivost

Občutljivost diagnostičnega testa: je verjetnost pozitivnega testa pri osebah, pri katerih je bolezen prisotna.

Občutljivost $PP / PP+LN = 14/14+11 = 0,56 \times 100 = 56\%$

Delež oseb z boleznijo pri katerih je test pozitiven.

V našem primeru je občutljivost CA 125 56%, kar pomeni, da smo izmerili zvišano koncentracijo CA 125 samo v 56% endometriozе. Pri ostali 44% je koncentracija TO CA 125 lažno negativna oz. nižja od 35 kU/L.

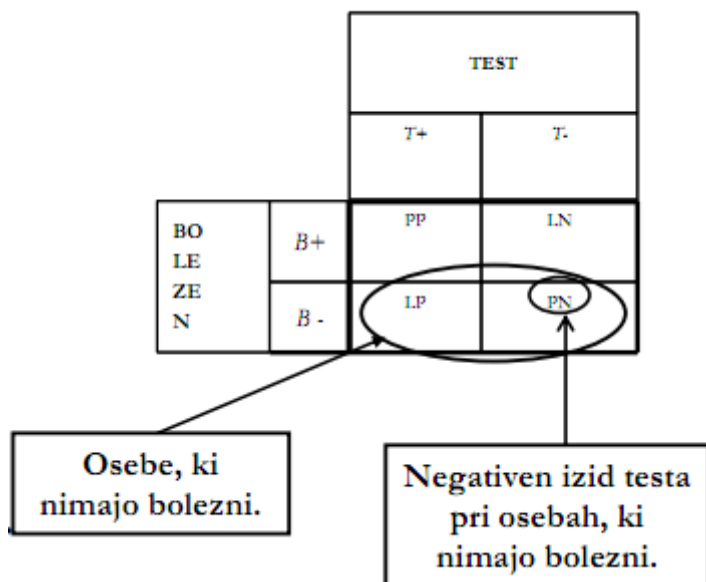


Slika 18: Graf občutljivosti CA 125

Specifičnost diagnostičnega testa: je verjetnost negativnega rezultata testa pri osebah, ki bolezni nimajo.

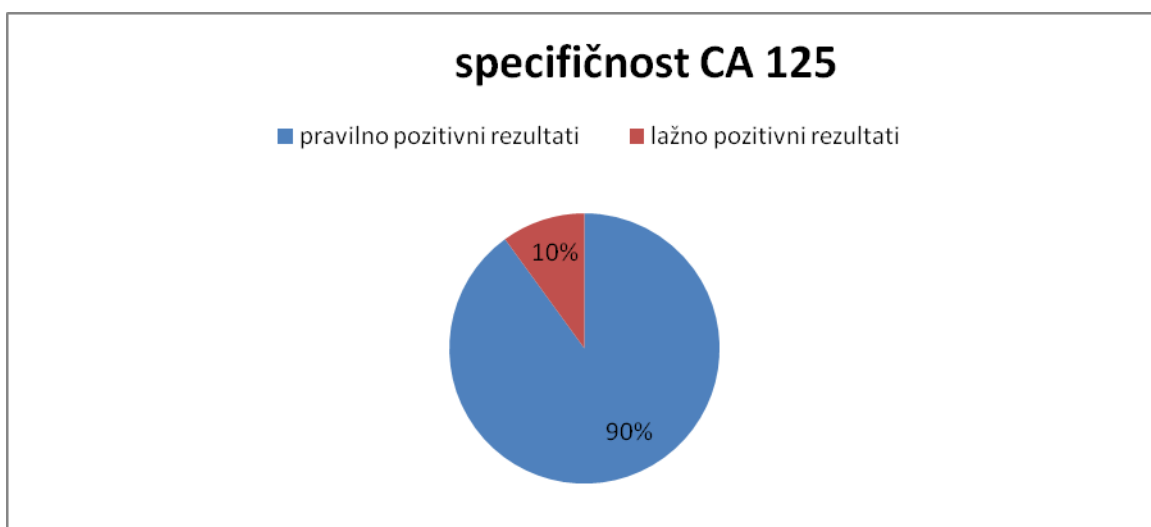
$$\text{Specifičnost} = \frac{PN}{PN + LP} = \frac{85}{85+9} = 0,90 \times 100 = 90\%$$

Delež oseb brez bolezni, pri kateri je test negativen.



Slika 19: Specifičnost

V naši raziskavi se je CA 125 izkazal za 90% specifičen tumorski označevalec za endometriozo. To pomeni, da smo dobili lažno pozitivne rezultate pri 10% oseb s povišano koncentracijo TO CA125, ki endometrioze niso imeli, ne moremo pa izključiti možnosti, da niso imeli katere oblike karcinoma ali drugega stanja, pri katerem je TO CA 125 prav tako povišan.



Slika 20: Graf specifičnosti CA 125

5. RAZPRAVA

Tumorski označevalci imajo v onkologiji številne možnosti uporabe, ki so odvisne od senzitivnosti in specifičnosti označevalca. Najpogosteje se uporabljajo za odkrivanje, spremljanje in zdravljenje malignih in tudi nekaterih benignih bolezni.

Tumorski označevalec CA 125 nastaja pri bolnicah z nemucinoznim rakom jajčnikov, pri bolnicah z malignimi in benignimi boleznimi (endometrijoza, ciste na jajčnikih, rak endometrija in rak materničnega vratu) in pri nekaterih ne ginekoloških malignih obolenjih, kot so rak pljuč, rak prostate in maligni mezoteliom peritoneja. Med embrionalnim razvojem nastaja tudi v celomskem epiteliju, Müllerjevih vodih, epitelnih celicah plevre, perikarda in peritoneja. Pri odrasli osebi ga najdemo v sluznici materničnega vratu in pljučnem parenhimu, ne najdemo ga pa v zdravem tkivu jajčnikov.

V naši raziskavi nas je zanimal pomen tumorskega označevalca CA 125 pri endometriozii. V raziskavo sta bili vključeni dve skupini žensk. Prva skupina je bila sestavljena iz vzorcev 25 bolnic z diagnozo endometrijoze. Druga skupina je bila kontrolna skupina bolnic brez endometrijoze sestavljena iz 94 vzorcev.

Vlogo in vrednost specifičnega tumorskega označevalca ter metodo določanja natančno opredelimo s pojmom občutljivost in specifičnost. Občutljivost označevalca nam pove, pri kolikšnem deležu bolnikov z nekim tumorjem je raven označevalca povišana. Čim večji je delež bolnikov z istovrstnim tumorjem, pri katerih je raven tumorskega označevalca povišana, tem bolj je občutljiv označevalec. V angleški literaturi smo zasledili, da je občutljivost TO CA 125 28%. Knjiga je bila napisana leta 2008. Rezultati naše raziskave so pokazali 56% občutljivost TO CA 125. Vrednost se razlikuje od tiste v literaturi, ki je lahko stara vrednost, novejših podatkov nisem zasledila. Vrednost 56% pomeni, da je koncentracija TO CA 125 zvišana nad 35 kU/L samo v 56% endometrijoze, medtem ko ima lahko ostalih 44% prisotno endometrijozo kljub vrednostim TO CA 125 pod 35 kU/L. Specifičnost predstavlja delež preiskovancev, ki nimajo rakavega obolenja in imajo normalno koncentracijo TO. To pomeni, da je TO tem bolj specifičen, čim manjkrat je prisoten pri ljudeh brez rakavega obolenja. V naši raziskavi se je CA 125 izkazal za 90% specifičen tumorski označevalec za endometrijozo. V angleški literaturi smo zasledili, da je specifičnost TO CA 125 90%, kar se popolnoma ujema z našimi izračunanimi rezultati.

90% specifičnost pomeni, da v 90% TO CA 125 ni prisoten v povišani koncentraciji pri ženskah brez endometrioze. To pomeni, da smo dobili lažno pozitivne rezultate pri 10% bolnic s povišanim TO CA125, ki endometrioze niso imele, ne moremo pa izključiti možnosti, da niso imele katere oblike karcinoma ali drugega stanja, pri katerem je TO CA 125 povišan.

Rezultate meritev koncentracij tumorskega označevalca CA 125 smo statistično obdelali. Uporabili smo statistični program SPSS 17.0. Zanimalo nas je ali se rezultati obeh skupin med seboj statistično razlikujejo. Najprej smo s programom SPSS 17.0 preverili ali se rezultati razporejajo po Gaussovi krivulji oz. ali se normalno porazdeljujejo. Test smo opravili na obeh skupinah. Uporabili smo enovzorčni Kolmogorov-Smirnov test. Za interpretacijo testa smo si zastavili dve hipotezi. Ničelna hipoteza je bila, da se vrednosti koncentracij TO CA 125 porazdeljujejo normalno, druga hipoteza pa, da se vrednosti koncentracij ne porazdeljujejo normalno. Od rezultatov tega testa je bil odvisno, ali bomo za nadaljnjo statistično obravnavo uporabili t-test za parametrične rezultate ali Mann-Whitney test za neparametrične rezultate. Pri Kolmogorov-Smirnov testu nas zanima predvsem vrednost P, od katere je odvisno ali bomo hipotezo zavrnil ali sprejeli. Če je P vrednost manjša od 0.05, zavrnilo ničelno hipotezo o domnevni normalni porazdelitvi. V primeru, da je izračunana P vrednost večja od 0.05, sprejmemo ničelno hipotezo normalne porazdelitve. V našem primeru je bila pri prvi skupini bolnic z endometriozo izračunana P vrednost 0.002, ki je manjša kot 0.05, zato smo ničelno hipotezo o normalni porazdelitvi zavrnilo in sprejeli drugo hipotezo, da se koncentracije TO CA 125 ne porazdeljujejo enakomerno. Enako smo storili tudi za drugo, kontrolno skupino brez endometrioze, pri kateri je bila P vrednost 0.005, se pravi, prav tako manjša kot 0.05. Tudi pri drugi skupini smo ničelno hipotezo o enakomerni porazdelitvi zavrnilo in sprejeli drugo hipotezo, ki pravi, da se koncentracije TO CA 125 ne porazdeljujejo normalno. Glede na rezultate, ki so pokazali, da se koncentracije v obeh skupinah ne porazdeljujejo normalno, smo za nadaljnje statistične obravnave uporabili Mann-Whitney neparametričen test.

Mann-Whitney test je neparametričen statističen test, ki primerja vzorce dveh neodvisnih skupin. Za medsebojno primerjavo ne uporablja izmerjenih vrednosti ampak le te razvrsti v range. Tudi pri tem testu smo si postavili dve hipotezi. Ničelna hipoteza je bila, da se skupini statistično ne razlikujeta in druga hipoteza, ki je bila osnovana na povprečni vrednosti rangov, ki so pokazale, da so vrednosti TO CA 125 v prvi skupini z endometriozo (povprečna vrednost rangov skupine z endometriozo = 90,90) bile višje kot v

kontrolni skupini (povprečna vrednost rangov kontrolne skupine = 51,78). Postavili smo stopnjo tveganja $\alpha = 0.05$. Enako kot pri prejšnjem testu, smo tudi tukaj ničelno hipotezo zavrnil. P izračunana je bila 0.00 in manjša kot 0.05. Sprejeli smo drugo hipotezo, ki pravi, da so vrednosti v skupini z endometriozo višje kot pri skupini brez endometrioze. Tudi povprečne vrednosti izračunane pri obeh skupinah so pokazale, da so vrednosti v skupini z endometriozo, kjer je povprečna vrednost znašala 72,17 kU/L, višje kot pri kontrolni skupini, kjer je bila povprečna vrednost 18,15 kU/L.

6. SKLEP

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti ali je tumorski označevalec CA 125 pri bolnicah z endometriozo klinično pomemben parameter ali ne.

Na podlagi rezultatov in statističnih izračunov lahko zaključimo naslednje:

- Izračunali smo 90% specifičnost. Ta rezultat nam pove, da smo dobili lažno zvišane koncentracije TO CA 125 pri 10% pacientov v kontrolni skupini brez endometrioze. Ne moremo izključiti možnosti, da teh 10% ni imelo katere druge oblike maligne ali benigne bolezni, pri kateri se koncentracija TO CA 125 prav tako poviša.
- Izračunali smo 56% občutljivost, kar je precej nizko. Rezultat nam pove, da je koncentracija TO CA 125 zvišana nad 35 kU/L v 56% endometrioze, medtem ko je v ostalih 44% lažno znižana. Zaradi nizke občutljivosti, moramo za diagnozo endometrioze uporabiti še druge diagnostične teste, kot so laparoskopija, ultrazvok, ginekološki pregled in druge preiskovalne metode.
- S statističnim Mann-Whitney testom smo potrdili, da se vrednosti TO CA 125 določene v kontrolni skupini in skupini z endometriozo med seboj statistično razlikujejo. Vrednosti koncentracije TO CA 125 v skupini z endometriozo so statistično višje kot v kontrolni skupini, kar lahko podpremo tudi s povprečno vrednostjo obeh skupin. Povprečna vrednost prve skupine z endometriozo je 72,17 kU/L, medtem ko je povprečna vrednost kontrolne skupine 18,14 kU/L.

7. LITERATURA

- (1) Martina Ribič – Pucelj: Endoskopske operacije v ginekologiji, Slovensko društvo za reproduktivno medicino, Didakta, Radovljica, 2007: 163–166, 168–170, 173–175, 179–180, 182, 189-190
- (2) <http://books.google.com/books?id=Q9ldvHVtWCUC&printsec=frontcover&hl=sl#v=onepage&q&f=false>
- (3) David McKay Hart, Jane Norman: Gynaecology illustrated, Fifth edition, Churchill livingstone, 2000: 125
- (4) John O. Schorge, Joseph I. Schaffer, Lisa M. Halvorson, Barbara L. Hoffman, Karen D. Bradshaw, F. Gary Cunningham: Williams GYNECOLOGY, The McGraw – Hill, Dallas, 2008: 226 - 238
- (5) Ash Monga: Gynaecology by ten teachers, 18th edition, Hodder Arnold, London, 2006: 117
- (6) Tina Šmuc, Martina Ribič – Pucelj, Tea Lanišnik – Rižner: MOLEKULARNE OSNOVE PATOGENEZE ENDOMETRIOZE , Zdravniški vestnik 77, 2008: 516
- (7) Charles R.B. Beckmann, Frank W. Ling, Roger P. Smith, Barbara M. Barzansky, William N. P. Herbert, Douglas W. Laube: Obstetric and gynaecology, Fifth edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2006: 300 - 302
- (8) Joško Osredkar: Izbrana poglavja iz klinične biokemije, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2008: 91 - 104
- (9) Srdjan Novaković: Tumorski označevalci v klinični onkologiji, Onkologija/Pregledi
- (10) <http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/1-2000-novakovic.pdf>
- (11) Srdjan Novaković: Pregled pomembnejših tumorskih označevalcev v klinični onkologiji, Onkološki inštitut, Ljubljana, 2000: 51

