



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

**Tumor markery na OKB Nemocnice Pelhřimov – metody  
stanovení, klinický význam**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

**Autor:** Kateřina Vacíková

**Vedoucí práce:** Ing. Irena Blažková

České Budějovice 2018

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Tumor markery na OKB Nemocnice Pelhřimov – metody stanovení, klinický význam*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

*Kateřina Vacíková*

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Ireně Blažkové za připomínky a rady poskytnuté při vedení této bakalářské práce. Zároveň bych ráda poděkovala MUDr. Karolovi Križanovi za poskytnutí dat o pacientech použitých v této práci.

# **Tumor markery na OKB Nemocnice Pelhřimov – metody stanovení, klinický význam**

## **Abstrakt**

Nádorová onemocnění jsou po nemocech srdce a cév nejčastější příčinou úmrtí v České republice. Každý rok je diagnostikována a přijata k léčbě řada nových pacientů s nádorovým onemocněním. Stanovení hladiny nádorových markerů je nedílnou součástí vyšetřovacích metod pro včasné zachycení nemoci, stanovení diagnózy a kontroly průběhu léčby. V současnosti zatím není k dispozici univerzální marker, proto se při analýzách stanovuje více rakovinných markerů, jejichž vzájemná specifita a senzitivita se překrývá.

V teoretické části se práce zabývá obecným popisem nádorových onemocnění. Další část je věnovaná nádorovým markerům, vlastnostem, hodnocení výsledků vyšetření a jejich rozdělení. Následně jsou charakterizovány jednotlivé nádorové markery vyšetřované na Oddělení klinické biochemie Nemocnice Pelhřimov, p. o.

Praktická část je věnovaná metodám stanovení nádorových markerů na Oddělení klinické biochemie Nemocnice Pelhřimov, p. o. Následuje popis principu stanovení tumor markeru na analyzátoru Cobas e601.

Experimentální část je věnovaná statistice vyšetření nádorových markerů za jednotlivé roky (2015–2017) získaná na Oddělení klinické biochemie Nemocnice Pelhřimov, p. o. V experimentální části se dále zabývá pacienty a hodnocením jejich výsledků.

Cílem bakalářské práce je zpracování přehledu nejdůležitějších a nejpoužívanějších nádorových markerů, stručná charakteristika a popis významu pro klinickou praxi. Práce dále uvádí laboratorní metody jejich stanovení včetně analytických parametrů, preanalytických požadavků a hodnocení výsledků vyšetření tumor marker. V závěru práce jsou uvedena statistická data získaná na pracovišti OKB a RTO Nemocnice Pelhřimov, p. o.

## **Klíčová slova:**

Tumor marker, OKB Nemocnice Pelhřimov, p. o., CEA, CA15-3, CA125, CA19-9, hCG, ICTP, PSA

## **Tumour marker at the Department of Clinical Biochemistry of Pelhřimov Hospital - methods of tumour marker determination, clinical significance**

### **Abstract**

Tumour diseases are the most common cause of death in the Czech Republic after heart and vessel diseases. Each year a number of new cancer patients are diagnosed and accepted for treatment. Determining the level of tumour markers is an integral part of screening methods for early detection of the disease, diagnosis and control of the course of treatment. Currently, no universal marker is available, so more markers of cancer, whose specificity and sensitivity are overlapping, are determined in the analysis.

In the theoretical part, the thesis deals with a general description of tumour diseases. Another part is devoted to tumour markers, characteristics, evaluation of the results of the examination and their division. Subsequently individual tumour markers investigated at the Department of Clinical Biochemistry of Pelhřimov Hospital, semi-budgetary organization, are described.

The practical part is devoted to the methods of tumour marker determination at the Department of Clinical Biochemistry of Pelhřimov Hospital, semi-budgetary organization. It is followed by the description of the principle of tumour marker determination on the Cobas e601 analyser.

The experimental part is devoted to the statistics of tumour markers for individual years (2015-2017) obtained from the Department of Clinical Biochemistry of Pelhřimov Hospital, semi-budgetary organization. Furthermore, in the experimental part I deal with patients and their evaluation of the results.

The aim of the bachelor thesis is to prepare a summary of the most important and most used tumour markers, a brief characterization and a description of the importance for clinical practice. The thesis also presents laboratory methods of their determination including analytical parameters, preanalytical requirements and the evaluation of tumour marker results. At the end of the thesis statistical data obtained at the workplace of OKB (the Department of Clinical Biochemistry) and RTO (the Department of Radiology) of Pelhřimov Hospital, semi-budgetary organization, are presented.

**Keywords:**

tumour marker, OKB (the Department of Clinical Biochemistry) Pelhřimov Hospital, semi-budgetary organization, CEA, CA15-3, CA125, CA19-9, hCG, ICTP, PSA

# Obsah

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
1.1 <i>Nádorová onemocnění</i> .....	10
1.2 <i>Maligní transformace buněk</i> .....	11
<b>2 NÁDOROVÉ MARKERY</b> .....	<b>12</b>
2.1 <i>Vlastnosti nádorových markerů</i> .....	12
2.2 <i>Hodnocení výsledků vyšetření tumor markerů</i> .....	13
2.2.1 Diagnostická senzitivita – (správná pozitivita) .....	13
2.2.2 Diagnostická specifická – (správná negativita) .....	14
2.2.3 Diagnostická efektivita (účinnost).....	14
2.2.4 Cut-off .....	14
2.2.5 ROC křivka (Receiver Operating Characteristics) .....	15
2.3 <i>ROZDĚLENÍ NÁDOROVÝCH MARKERŮ</i> .....	16
2.4 <i>CHARAKTERISTIKA JEDNOTLIVÝCH NÁDOROVÝCH MARKERŮ</i> .....	17
2.4.1 CEA (KARCINOEMBRYONÁLNÍ ANTIGEN) .....	17
2.4.2 AFP (ALFA-1-FETOPROTEIN).....	18
2.4.3 CA 15-3 .....	19
2.4.4 CA 125 .....	20
2.4.5 CA 19-9.....	21
2.4.6 CA 72-4.....	22
2.4.7 CYFRA 21-1 (Fragment cytokeratinu 19) .....	22
2.4.8 hCG (LIDSKÝ CHORIOGONADOTROPIN) .....	23
2.4.9 ICTP (C terminální peptid kolagenu I).....	24
2.4.10 PSA (PROSTATICKÝ SPECIFICKÝ ANTIGEN).....	25
2.4.11 NSE (NEURONSPECIFICKÁ ENOLÁZA) .....	26
2.4.12 ProGRP (ProGastrin-Releasing Peptide) .....	26
2.4.13 S-100 (Protein) .....	27
<b>3 CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY</b> .....	<b>29</b>
<b>4 METODIKA A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ ODDĚLENÍ KLINICKÉ BIOCHEMIE NEMOCNICE PELHŘIMOV, p. o.</b> .....	<b>30</b>
4.1 <i>Metody stanovení nádorových markerů</i> .....	30
4.2 <i>Antigeny</i> .....	30
4.3 <i>Protilátky</i> .....	31
4.3.1 Polyklonální protilátky.....	32
4.3.2 Monoklonální protilátky.....	32
4.4 <i>Interakce antigen-protilátka</i> .....	33
4.5 <i>Imunoanalytické metody</i> .....	34
4.5.1 Kompetitivní (soutěživé) metody .....	34
4.5.2 Nekompetitivní (nesoutěživé) metody – sendvičová technika .....	35
4.5.3 Heterogenní metody .....	36

4.5.4	Homogenní metody .....	36
4.5.5	Radioimunoanalýza (RIA) .....	37
4.5.6	Imunoradiometrická analýza (IRMA) .....	37
4.5.7	ELISA (Enzyme – Linked ImmunoSorbent Assay) .....	37
4.5.8	Elektrochemiluminiscenční metoda .....	38
4.6	<i>Možnosti využití tumor markerů v klinické praxi</i> .....	38
4.7	<i>Charakteristika pracoviště OKB Nemocnice Pelhřimov</i> .....	40
4.7.1	Podmínky měření nádorových markerů .....	41
4.8	<i>Principy stanovení tumor markeru na analyzátoru Cobas e 601</i> .....	42
4.8.1	Analyzátor Cobas e 601 .....	42
4.8.2	Přístrojové vybavení analyzátoru Cobas e 601 .....	42
4.8.3	Princip a postup metody .....	44
4.9	<i>Metoda UniQ ICTP RIA</i> .....	45
4.9.1	Princip testu .....	45
4.9.2	Pracovní postup .....	46
4.9.3	Specifikace přístroje .....	46
<b>5</b>	<b>Experimentální část</b> .....	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>64</b>
	<b>Použité zdroje</b> .....	<b>65</b>
	<b>Seznam obrázků:</b> .....	<b>69</b>
	<b>Seznam tabulek:</b> .....	<b>69</b>
	<b>Seznam grafů:</b> .....	<b>70</b>
	<b>Seznam zkratk:</b> .....	<b>71</b>



## ÚVOD

Nádorová onemocnění se můžou objevit u kohokoliv: mladých – starých, bohatých – chudých, mužů, žen i dětí. V posledních letech dochází k výraznému zvýšení výskytu onkologických onemocnění, která jsou po kardiovaskulárních onemocněních nejčastější příčinou úmrtí lidí v ČR. Mnoha těmto úmrtím se dá v dnešní době již předejít. Na různá nádorová onemocnění se přichází v raném stadiu nemoci, kdy se dají léčit a odstranit. V pozdním stadiu rakoviny se dá utrpení pacientů alespoň zmírnit dobrou tišící léčbou. Nejdůležitějším faktorem pro úspěšnou léčbu je tedy včasná diagnostika nádoru.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 *Nádorová onemocnění*

Nádorové onemocnění znamená vznik tkáně, ve které se růst buněk vymkl kontrolním mechanismům buněčné proliferace. Vzhledem k aktivitě proliferace rozlišujeme nádory benigní (nezhoubné), intermediární nádory a nádory maligní (zhoubné).

Benigní nádory rostou pomalu, jsou ohraničené, opouzdřené a netvoří metastázy. Po chirurgickém zákroku je ve většině případů pacient vyléčen.

Intermediární nádory tvoří rozhraní mezi benigními a maligními nádory. Mají lepší prognózu než maligní nádory. Na rozdíl od benigních nádorů recidivují, v některých případech mohou metastazovat do regionálních lymfatických uzlin nebo vzdálených míst.

Maligní nádory rostou invazivně, rychle a jsou neohraničené. Pronikají do okolních tkání a poškozují strukturu a funkci orgánu. Tyto nádory jsou schopné metastazovat do jiných částí těla. Chirurgické odstranění je obtížné vzhledem k neohraničenému nádoru. Maligní nádory spotřebovávají mnoho energie, proto pacienti s touto nemocí trpí únavou a výrazným úbytkem na váze. (Mačák et al., 2012)

Zhoubné nádory lze charakterizovat jako nekontrolovatelný růst buněčné populace na úkor okolní tkáně. Jakmile se růst a vývoj normální buňky vymkne biologickým mechanismům, objeví se nádorové buňky. Vznik a vývoj nádoru se označuje jako kancerogenní proces. Kancerogeneze je vícestupňový proces přeměny normálních buněk v buňky nádorové. Podstatou kancerogeneze je postupné hromadění genetických změn, epigenetických a biochemických, které poskytují nádorovým buňkám růstovou výhodu a výsledkem těchto změn je invazivní růst nebo metastazování nádorové tkáně. (Adam et al., 2011)

Průběh kancerogeneze bývá členěn do tří stádií:

1. **Iniciační stádium:** představuje prvotní mutaci určitého kritického genu. Jde o období časově krátké, ale nevratné. Touto mutací buňka získává potenciál pro maligní transformaci, v tomto stádiu lze proces ještě zastavit.
2. **Promoční stádium:** postižené buňky jsou stimulovány k intenzivnějšímu množení. Toto stádium trvá léta až desetiletí. Promoční faktory samy o sobě

nejsou schopny vyvolat nádorovou transformaci, jen ji podpořit. Proces kancerogeneze lze zpomalit nebo i zastavit odstraněním promočních faktorů.

3. **Progrese:** stádium progrese je charakterizováno dalším postupným nahromaděním genetických mutací. Vzniklý nádor může zůstat v místě vzniku nebo se šířit do nejbližšího okolí (invaze) a do vzdálených míst cestou krevního oběhu (metastáze). Velmi důležitou podmínkou pro růst nádoru je dostatečný přísun živin a kyslíku, který musí být zajištěn vytvořením cévního zásobení. (Atwood et al., 2006)

### ***1.2 Maligní transformace buněk***

Maligní transformace tkáňových buněk je proces, při kterém normální tkáňové buňky ztrácejí vlastnosti diferencovaných buněk. Nejčastější příčinou je akumulace genetických poruch, které aktivují buněčné protoonkogeny a inaktivují antionkogeny. Protoonkogeny jsou označovány geny, které kódují bílkoviny podílející se na přenosu růstových a diferenciacních signálů do nitra buňky. Určují progresi buněčného cyklu a buněčnou diferenciaci. Antionkogeny se podílejí na kontrole buněčného růstu a diferenciaci buňky, jejich inaktivace nebo dysfunkce vede k buněčné transformaci a nekontrolovanému buněčnému dělení. Množení buněk v organismu je velmi pečlivě řízeno v závislosti na stádiu života jedince. V časných fázích života jedince množení buněk převažuje nad zanikáním, v dospělosti je v rovnováze a v pokročilém věku života začíná převažovat involuce. Problém nastane tehdy, pokud se buňky vymknou kontrole replikace a změní se v nádorové buňky. Přeměna buňky v buňku nádorovou je vyvolána mutacemi, které se týkají regulace buněčného dělení, realizace oprav DNA a buněčné smrti (apoptózy). Buňky, které si zachovaly svůj vzhled i funkci a zůstávají na místě, kde vznikly se nazývají benigní buňky. Pokud buňky ztratily většinu svých původních vlastností (ztráta diferenciaci), mají snahu dále pronikat do svého okolí (invazivita) i na vzdálená místa (metastazování) nazývají se buňkami maligními. (Svobodová et al., 2012)

## 2 NÁDOROVÉ MARKERY

Nádorové markery umožňují v současné době zcela nové přístupy v léčbě onkologicky nemocných pacientů. Mohou přispět k rozlišení mezi benigním a maligním nádorem, k určení stadia onemocnění, a především jsou vhodné pro včasný záchyt recidivy onemocnění. Proto indikované použití vhodného markeru může rozhodujícím způsobem přispět k výsledku léčby, a tím zlepšit dobu přežití nemocného. Nádorové markery představují široké spektrum molekul velmi rozdílných vlastností, které jsou produkovány nebo vyvolány nádorovou buňkou. Lze je definovat jako molekuly převážně proteinového charakteru, které jsou přítomny v organismu v důsledku vzniku a vývoje maligního procesu. O výběru nádorových markerů před terapií a v průběhu léčby se rozhoduje na základě klinického a histologického nálezu. Od látek produkováných normálními buňkami se liší buď kvalitativně (nádorově specifické, normální buňky je neprodukují) či kvantitativně (nádory asociované, přítomné i u normálních buněk). Může se jednat o antigeny lokalizované na povrchu membrán, enzymy metabolických drah, imunoglobuliny a jejich fragmenty, hormony, fragmenty komplexních glykoproteinů a cytokeratinů, molekuly receptorové povahy a dalších. (Atwood et al., 2006)

U jednotlivých malignit rozlišujeme markery hlavní, vedlejší a doplňkové.

**Hlavní marker:** marker první volby s vysokou senzitivitou a specifitou pro daný druh nádoru.

**Vedlejší marker:** marker druhé volby, který se stanovuje zpravidla paralelně s markerem první volby. Má menší senzitivitu a specifitu pro daný nádor, ale v kombinaci s hlavním markerem zvýší záchyt příslušného tumoru.

**Doplňkový marker:** má většinou poměrně nízkou senzitivitu a specifitu pro detekci maligního onemocnění, ale bývá specifický pro konkrétní orgán (tedy může mít vysokou orgánovou specifitu). Kromě toho jeho pozitivita bývá signálem generalizace tumoru. (NÁDOROVÉ MARKERY A JEJICH STANOVENÍ, 1998)

### 2.1 *Vlastnosti nádorových markerů*

Nádorové markery mohou přispět k rozlišení onemocnění mezi benigním a maligním, k určení primární diagnostiky, k odhalení prognózy (prognostické markery), odpovědi na léčbu (prediktivní markery). Především jsou vhodné ke sledování průběhu (monitorování)

choroby, účinnosti terapie a k včasnému záchytu progresu a recidivy nádoru. Proto indikované použití vhodného markeru může přispět k výsledku léčby, a tím zlepšit dobu přežití nemocného. (Svobodová et al., 2012)

## **2.2 Hodnocení výsledků vyšetření tumor markerů**

Při hodnocení laboratorních metod je nutno znát parametry analytické, ale i parametry klinické, které jsou závislé na diagnóze pacienta. Na základě těchto parametrů se mohou mezi sebou porovnávat účinnost biochemických metod z hlediska schopnosti metody rozlišovat zdravé a nemocné. Diagnostická hodnota určitého nádorového markeru závisí na prevalenci onemocnění, na specifitě a senzitivitě stanovení daného nádorového markeru. Vztah mezi senzitivitou a specifitou vyjadřuje ROC křivka. Pro hodnocení nádorových markerů se využívá označení referenční hladiny Cut-off, kterou si každá laboratoř sama určuje. Je definována jako koncentrace, pod kterou se nachází většina sérových hodnot zdravých lidí i nemocných s benigním onemocněním. Pokud se jedná o sledování efektu léčby, pod hladinu cut-off by se mělo nacházet 95% hodnot pacientů v remisi. (Svobodová et al., 2012)

Podle výsledků laboratorních metod můžeme osoby rozdělit do 4 skupin.

- Nemocné s pozitivním výsledkem testu (Správně pozitivní – SP)
- Nemocné s negativním výsledkem testu (Falešně negativní – FN)
- Zdravé s pozitivním výsledkem testu (Falešně pozitivní – FP)
- Zdravé s negativním výsledkem testu (Správně negativní – SN)

### **2.2.1 Diagnostická senzitivita – (správná pozitivita)**

Slouží k diagnostice nemoci. Hodnotí laboratorní metodu podle toho, jak je schopna zjistit přítomnost nemoci. Může nabývat hodnot 0-1 (0-100%). Čím vyšší senzitivita, tím lépe test diagnostikuje přítomnost nemoci. (Racek et al., 2006)

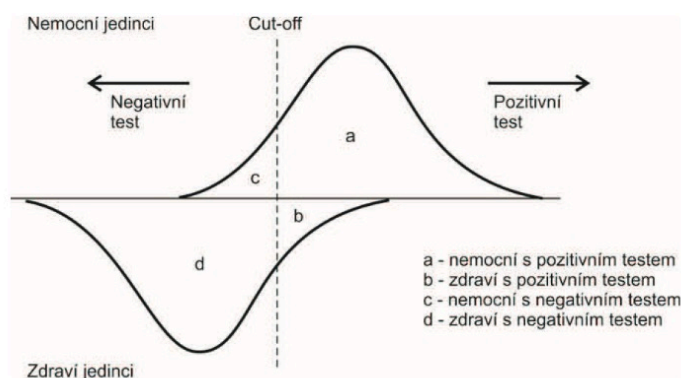
$$\text{Diagnostická senzitivita} = \frac{\text{počet správně pozitivních výsledků}}{\text{celkový počet nemocných}} = \frac{SP}{SP+FN}$$

### 2.2.2 Diagnostická specifčnost – (správná negativita)

Určuje se ve skupině zdravých lidí. Vyjadřuje pravděpodobnost negativního výsledku u zdravé osoby. Používá se k vyloučení nemoci u skupin zdravých osob. Pohybuje se v rozmezí 0-1 (0-100%). Je vhodné, aby laboratorní metoda měla pokud možno co největší hodnotu diagnostické specifčnosti. Čím je specifčnost vyšší, tím lépe dokáže vytřídit zdravé osoby ze sledovaného souboru. (Racek et al., 2006)

$$\text{Diagnostická specifčnost} = \frac{\text{počet správně negativních výsledků}}{\text{celkový počet zdravých}} = \frac{SN}{SN+FP}$$

Obrázek 1 Diagnostická specifčnost



Zdroj: KARLÍKOVÁ, Marie a TOPOLČAN, Ondřej, 2013. *Principy imunoanalytických metod pro medicínu*

### 2.2.3 Diagnostická efektivita (účinnost)

Vyjadřuje schopnost metody správně zařadit zdravé i nemocné jedince. Metoda bude poskytovat pozitivní výsledky u nemocných a zároveň negativní výsledky u zdravých. (Racek et al., 2006)

$$\text{Diagnostická efektivita} = \frac{\text{všichni správně zařazení}}{\text{všechny vyšetřované osoby}} = \frac{SP+SN}{SN+SP+FN+FP}$$

### 2.2.4 Cut-off

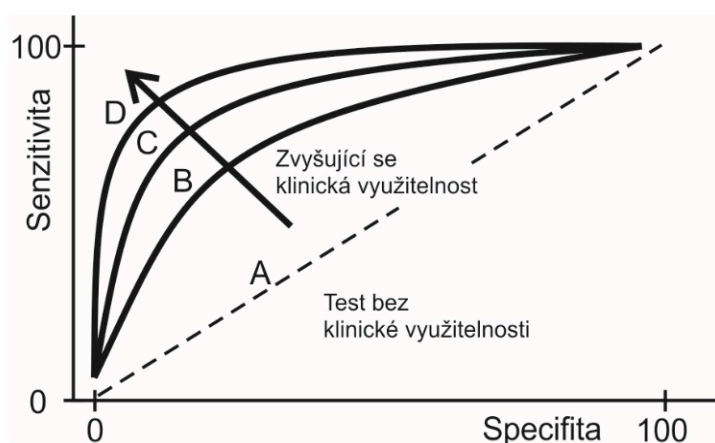
Hodnota výsledku laboratorní zkoušky, podle které se v praxi rozliší osoby s přítomností nemoci od zdravých osob. Při jejím překročení se přistoupí k činnosti (určí se diagnóza, dojde k zahájení léčby, ...). Je nastavována tak, aby pro daný účel byl optimální poměr mezi senzitivitou a specifčností (např. u screeningu co nejvyšší senzitivita, při prevenci

rizikového terapeutického zásahu u zdravé osoby naopak vysoká specifičnost). (Švanger a Šigutová, 2014)

### 2.2.5 ROC křivka (Receiver Operating Characteristics)

Vyjadřuje vztah senzitivity a specifity v závislosti na různě zvolených hodnotách cut-off. Velké zakřivení křivky zaručuje vhodnost daného markeru pro vybranou skupinu onemocnění. Dále je nutné zjistit, s jakou pravděpodobností je vyšetřovaná osoba nemocná při pozitivním výsledku testu a s jakou pravděpodobností je osoba skutečně zdravá při negativním výsledku testu. (Nekulová et al., 2006)

Obrázek 2 ROC křivka



Zdroj: KARLÍKOVÁ, Marie a TOPOLČAN, Ondřej, 2013. *Principy imunoanalytických metod pro mediky*

Ideální nádorový marker by měl mít co největší senzitivitu při vysoké specifičnosti. Obě tyto hodnoty by se měly blížit k 100 %. Ideální nádorový marker by měl splňovat určitá kritéria:

1. Vysoká specifičnost – nádorový marker je produkován pouze u maligních onemocnění
2. Vysoká senzitivita – průkaz všech maligních nádorů již ve velmi časném stadiu onemocnění
3. Vysoká orgánová specifičnost
4. Vyskytuje se ve vysokých koncentracích v biologických tekutinách
5. Koncentrace koreluje s velikostí nádoru, se stádiem onemocnění a s prognózou

6. Koncentrace koreluje s efektem léčby
7. Po léčbě umožňuje průkaz zbytkové nádorové tkáně (nejčastěji po chirurgické operaci) (Hopley a Schalkwyk, 2001)

V klinické praxi neexistuje v současné době žádný nádorový marker, který by splňoval tato kritéria. Vzhledem k poměrně nízké diagnostické senzitivitě a nízké specifitě není většina nádorových markerů vhodná ke screeningu. Podmínkou pro screening je senzitivita 97 % při 95% specifitě. Nádorové markery nejsou vhodné pro prvotní diagnostiku onemocnění vzhledem k malé orgánové specifitě.

Hlavní význam stanovení nádorových markerů spočívá ve sledování průběhu choroby (recidiva, progresse) a efektu terapie. Dále jsou nádorové markery využívány pro cílený screening, tj. vyšetřování rizikových skupin jedinců ohrožených konkrétním typem nádorového onemocnění. Nádorové markery je nezbytné vyšetřit před zahájením jakékoliv léčby, např. před chirurgickým zákrokem, před nasazením cytostatik nebo radioterapie. Výběr nádorového markeru vychází z předpokládané lokalizace nádoru, stádia onemocnění, histologické struktury a buněčné diferenciaci nádorových buněk. Pokud je nádorové bujení v pokročilejším stádiu, roste také pravděpodobnost zvýšení koncentrace nádorových markerů.

Po nasazení léčby se v prvních dvou letech doporučuje stanovovat nádorové markery každý měsíc. Pokud léčba byla úspěšná, intervaly se prodlužují. Nadále je třeba pravidelné sledování alespoň v ročním intervalu. Správně indikované vyšetření nádorových markerů může přispět především k včasnému zachytu recidivy či prognóze onemocnění, a tím i k rychlejšímu terapeutickému zákroku, který by mohl prodloužit život nemocného. (Čermáková et al., 2005)

### **2.3 ROZDĚLENÍ NÁDOROVÝCH MARKERŮ**

Nádorové markery se všeobecně dělí na tři skupiny. Onkofetální, tkáňově a orgánově specifické a orgánově nespecifické antigeny.

#### **Onkofetální antigeny**

Látky vyskytující se v poměrně vysokých koncentracích u plodu, hrají významnou roli ve vývoji plodu. Po narození se tvoří jen v souvislosti s nějakým onemocněním, zpravidla nádorovým. U zdravých dospělých jedinců je jejich hladina velice nízká, přesná



biologická funkce není známa. U většiny nádorových onemocnění se jejich aktivita výrazně zvyšuje. Mezi tyto látky patří např.: AFP, lidský choriový gonadotropin (hCG), karcinoembryonální antigen (CEA), placentární alkalická fosfatáza (PLAP). Vyskytují se u diferencovaných nádorů. Patří sem většina nádorových markerů.

### **Tkáňově či orgánově specifické antigeny**

Látky, které se nacházejí ve zdravé tkáni, orgánu a mimo ně pronikají jen v minimálním množství. Při nádorovém onemocnění, zánětech, traumatizaci dochází k jejich uvolňování. Např. prostatický specifický antigen (PSA), dnes již málo používaný při předoperačních vyšetření velmi významná prostatická kyselá fosfatáza (PAP), neuron-specifická enoláza (NSE), mozkový S-100b protein, rozpustné fragmenty cytokeratinů (TPA, TPS, CYFRA21-1). (Lothar, 1998)

### **Nespecifické antigeny, Enzymy, Hormony**

Jsou produkovány nádory z orgánů, které je normálně neprodukují. Např. Thymidinkináza (TK). (Exkschlager a Průša, 2002; Svobodová et al., 2012)

## **2.4 CHARAKTERISTIKA JEDNOTLIVÝCH NÁDOROVÝCH MARKERŮ**

Vzhledem k velkému počtu nádorových markerů budou popsány pouze klinicky významné nádorové markery používané na pracovišti OKB Nemocnice Pelhřimov, p. o.

### **2.4.1 CEA (KARCINOEMBRYONÁLNÍ ANTIGEN)**

**Vlastnosti:** Tento onkofetální protein patří k nejdéle vyšetřovaným markerům (objeven v roce 1965). Patří do skupiny molekul, které ovlivňují buněčnou adhezi a též do skupiny karcinofetálních antigenů, které jsou vytvářeny během embryonálního a fetálního období. Skupina genů pro CEA je zastoupen 17 aktivními geny ve dvou podskupinách. První skupina zahrnuje CEA a NCA (nespecifické reaktivní antigeny). Druhá skupina zahrnuje specifické těhotenské glykoproteiny (PSG).

**Biologický poločas:** 14 dnů

**Funkce:** CEA patří do imunoglobulinové supergenové skupiny podílející se pravděpodobně na procesu adheze a metastazování buněk.

**Výskyt:** CEA je onkofetální bílkovinou, kterou lze prokázat v epitelových buňkách především trávicího ústrojí a bronchů. V prvním trimestru je obsažen v buněčné cytoplazmě. V pozdějších fázích vývoje plodu je součástí povrchu buněčných membrán. V dospělosti je omezeně syntetizován epitelovými buňkami střevní sliznice, žaludku, slinivky a bronchů.

**Klinické využití:** Pro screening ani diagnostiku nelze CEA využít. Používá se pro monitorování průběhu onemocnění a odpovědi na léčbu.

**Maligní onemocnění:** Produkci CEA vykazují karcinomy trávicího ústrojí, plic, mléčné žlázy, nádory ženských pohlavních orgánů (vaječníků), štítné žlázy, močového měchýře, dělohy, prostaty. Nejvyšší senzitivita markeru CEA kolem 60 % je při návratu onemocnění pro kolorektální karcinom a pro nádory žaludku 50 %.

**Benigní onemocnění:** Jsou např.: jaterní cirhóza, Crohnova choroba, střevní polypy, onemocnění plic, ledvin, žlučníku, pankreatitida, benigní onemocnění prsu, kuřáctví a alkoholismus. (Šimíčková a Nekulová, 2004)

#### **2.4.2 AFP (ALFA-1-FETOPROTEIN)**

**Vlastnosti:** AFP je glykoprotein o molekulové hmotnosti přibližně 67-72 kDa. Na jednoduchý polypeptidový řetězec (590 aminokyselin) je navázáno 3-5 % sacharidů. Svoji strukturou je AFP podobný albuminu, v molekule AFP jsou výrazněji obsaženy aminokyseliny, glycin, serin a isoleucin.

**Biologický poločas:** 5 dní

**Fyziologická funkce:** Významná je především jeho role transportní (vazba steroidů, některých těžkých kovů, bilirubinu, mastných kyselin, retinoidů, drog a antibiotik apod.) a funkce v imunitních a metabolických procesech. AFP též spojen s regulací růstu a antioxidačními procesy. U plodu zprvu nahrazuje albumin a jeho transportní funkce.

**Výskyt:** AFP je onkofetální protein vytvářen ve vysoké koncentraci v embryonálním žloutkovém vaku (od 10. dne po oplodnění do 10. týdne gravidity) a ve fetálních játrech (od 10. týdne gravidity). U dospělého zdravého jedince je syntéza AFP redukována na minimum. V séru matky, kam přechází přes placentu, je důležitým ukazatelem těhotenství. Zvýšená koncentrace AFP v séru matky nebo plodové vodě během

těhotenství může indikovat anencefalii, spina bifida, atresii jícnu nebo vícečetné těhotenství.

**Klinické využití:** Stanovení AFP se nedoporučuje pro screening karcinomů. Stanovení AFP je přínosné při odhadování rizika trisomie 21(Downův syndrom) u plodu.

**Maligní onemocnění:** Stanovení AFP v séru je vhodné pouze u symptomatických nemocných s jaterní cirhózou a u nemocných s podezřením na germinativní nádory varlat (nesestouplé varle, nádory testes u sourozence – dvojčete). Monitorování průběhu onemocnění patří k základním využitím AFP. Pro hepatocelulární (jaterní) karcinom je AFP markerem první volby (senzitivita u neléčeného onemocnění je až 80 %). Pro embryonální karcinomy a nádory žloutkového vaku dosahuje až 80 % senzitivity. Zvýšené koncentrace se vyskytují u karcinomů žaludku, žlučových cest, pancreatu, vaječnicků, střev.

**Benigní onemocnění:** Zvýšené hladiny koncentrace AFP způsobující falešnou pozitivitu mohou způsobit tato benigní onemocnění: akutní virová i chronická hepatitida, cirhóza i nekróza jater, fyziologické a patologické těhotenství. (Schneiderka et al., 2000)

### 2.4.3 CA 15-3

**Vlastnosti:** Patří mezi markery diferenčního typu. Je to onkofetální mucinový glykoprotein bez orgánové specifity. CA 15-3 bývá produkován především nádory žlázového epitelu a epitelu mléčné žlázy. Jde o antigen polymorfního epiteliálního mucinu PEM nazývaný rovněž MUC 1. Molekulová hmotnost proteinu je 300-450 kDa – tvořena 0-glykosylovanými opakovanými sekvencemi 20 aminokyselin. (Duffy, 1999)

**Biologický poločas:** 7 dní

**Fyziologická funkce:** Funkce antigenu CA 15-3 není přesně známa. Pravděpodobně se účastní vazby na adhezivní molekuly typu ICAM-1 (intercelulární adhezivní molekula - 1). Tato vazba může být zodpovědná za usnadnění metastazování nádoru nebo za potlačení protinádorové odpovědi aktivovaných lymfocytů.

**Výskyt:** Vyskytuje se u plodu v epitelových buňkách bronchů a jater. U dospělých je to povrchový antigen.

**Klinické využití:** Stanovení nelze použít pro screening nemocných s karcinomem prsu a též pro stanovení této diagnózy. Hlavní využití CA-15-3 v séru patří k základní technice pro monitorování nemocných s karcinomem prsu. Je nejvhodnějším markerem pro sledování nemocných s karcinomem prsu vzhledem k možné další progresi i hodnocení terapeutických efektů. Bývá doplňován sledováním CEA a proliferačního markeru TPA, nebo ICTP, zejména pro rozpoznání kostních metastáz.

**Maligní onemocnění:** Patologické zvýšení v séru je typické pro karcinom prsu, karcinomu ovaria, děložního čípku, plic, prostaty.

**Benigní onemocnění:** CA-15-3 v séru benigní onemocnění prsu, benigní onemocnění trávicího ústrojí, jaterní cirhóza, akutní a chronická hepatitida, chronická bronchitida, pneumonie. (Valík, 2014)

#### 2.4.4 CA 125

**Vlastnosti:** CA-125 je heterogenní glykoprotein s vysokým obsahem sacharidů. Molekulová hmotnost 200 kDa. CA-125 má proteinovou strukturu spojenou s uhlovodíkovými bočními řetězci. V současné době je tento marker nejčastěji využíván k diagnostice karcinomu ovaria. Řadí se mezi nejspolehlivější markery pro toto onemocnění.

**Biologický poločas:** 4 dny

**Fyziologická funkce:** Nejasná

**Výskyt:** CA-125 je produkován fetálními epitelovými tkáněmi coelomového původu. U dospělých může být omezeně syntetizován v epitelu zdravé tkáně vejcovodů, bronchů, endometria, cervixu, ale i v mezotelu pleury, perikardu a peritonea. Není prokazatelný v epitelu zdravých ovarií.

**Klinické využití:** Screening CA-125 v séru nemocných s karcinomem ovárií je prováděn pouze v případě genetické zátěže. Je vhodný pro potvrzení stadia choroby.

**Maligní onemocnění:** Zvýšená koncentrace CA-125 byla kromě karcinomu ovárií prokázána u hepatocelulárního karcinomu. Nárůst koncentrace markeru může předcházet klinickou diagnózou o 1-8 měsíců. Po odstranění primárního nádoru klesá koncentrace CA-125 o 75-90% během prvního týdne. Do 2-3 týdnů se hodnoty normalizují.

**Benigní onemocnění:** Zvýšené hladiny CA-125 lze nalézt u benigních gynekologických onemocnění (cysty, metaplasie vaječnicků, endometria, u leiomyomu nebo selhání ledvin). Se slabým zvýšením hladiny CA-125 je nutné počítat u těhotných žen a v mateřském mléce, při menstruaci, zápalu plic, cirhóze. (Dastyk et al., 2011)

#### 2.4.5 CA 19-9

**Vlastnosti:** CA 19-9 se vyskytuje jako glykolipid ve tkáni nebo mucin v séru. Molekulová hmotnost 36 kDa (lipid) ev. výrazně vyšší (mucin). Marker CA 19-9 nezpůsobuje rakovinu, spíše je to protein, který je vylučován nádorovými buňkami. Využívá se pro sledování průběhu onemocnění.

**Biologický poločas:** 5 dní

**Fyziologická funkce:** Není známa

**Výskyt:** CA 19-9 úzce souvisí s Lewisdeterminantou krevní skupinou. U vzácně se vyskytující Lewis (a-/b-) skupiny tento nádorový marker není produkován. U plodu se vyskytuje v epitelových buňkách (trávicího traktu, pankreatu, jater). U dospělých je produkován v omezené míře epiteliálními buňkami bronchů a trávicího ústrojí. V minimálních koncentracích se vyskytuje v krvi, pleurálním výpotku, ascitu a mozkomíšním moku. CA 19-9 se výhradně eliminuje žlučí.

**Klinické využití:** CA 19-9 není vhodný pro screening a stanovení primární diagnózy. Využíván při sledování léčby a monitorování pacienta při karcinomu pankreatu, diagnostice a monitorování léčby karcinomu žlučníku a žlučových cest, jater (doplňkový marker k AFP), monitorování kolorektálního karcinomu (v kombinaci s CEA).

**Maligní onemocnění:** Vysokou senzitivitu dosahuje podle závažnosti onemocnění u karcinomu kolorekta, cholangiocelulárních karcinomů, u nádorů žlučových cest a žaludku. Koncentrace CA19-9 dobře koreluje s účinností terapie.

**Benigní onemocnění:** U benigního onemocnění může způsobit výrazné zvýšení koncentrace CA 19-9 v séru i mírná cholestáza, zvýšené koncentrace se vyskytují u benigních a zánětlivých onemocnění žaludku, střeva, pankreatu a jater. (Valík, 2014)

#### 2.4.6 CA 72-4

**Vlastnosti:** Nádorový antigen CA 72-4 je definován na podkladě dvou monoklonálních protilátek B 72-3 a CC-49. Monoklonální protilátka B 72-3 reaguje s membránovým antigenem získaným z karcinomu prsu.

**Biologický poločas:** 3-7 dní

**Fyziologická funkce:** Dosud neznámá

**Výskyt:** CA 72-4 patří do skupiny onkofetálních antigenů. Je to glykoprotein (mucinový komplex) produkovaný v embryonálním období epiteliálními buňkami žaludku a pancreatu.

**Klinické využití:** Marker CA 72-4 není vhodný pro screening a stanovení diagnózy. Uplatní se k monitorování průběhu onemocnění u karcinomu žaludku a pancreatu, při nádorech střeva, mléčné žlázy a určitých typů nádorů vaječníku.

**Maligní onemocnění:** CA 72-4 tento marker má vysokou specifitu u maligních onemocnění, ale poměrně nízkou senzitivitu. Proto se často používá při sledování onemocnění v kombinaci s dalšími markery. Dále je vhodný ke sledování nemocných s karcinomem žaludku, dolní třetiny jícnu, tlustého střeva a pancreatu. Též vhodný marker, který doplňuje sledování u nemocných s nádory kolorekta neprodukujících CEA nebo CA 19-9.

**Benigní onemocnění:** CA 72-4 v séru může být zvýšen u jaterní cirhózy, akutní pankreatitidy, chronické bronchitidy, vředové choroby žaludku a zánětlivých onemocnění GIT. (Exkschlager a Průša, 2002)

#### 2.4.7 CYFRA 21-1 (*Fragment cytokeratinu 19*)

**Vlastnosti:** Cyfra 21-1 patří do skupiny cytokeratinových markerů. Je to polypeptid o molekulové hmotnosti 40 kDa. Tento marker je blízce příbuzný tkáňovému polypeptidovému antigenu (TPA). Jedná se o rozpustný fragment cytokeratinu 19 identifikovaný monoklonální protilátkou BM 21-1. Cytokeratin 19 je kyselý protein. Vyskytuje se v epitelových buňkách skvamozního typu, a proto má vyšší orgánovou specifičnost.

**Fyziologická funkce:** Cyfra 21-1 patří mezi cytoskeletální proteiny.

**Výskyt:** Tento polypeptid je omezeně produkován ve tkáni plic, dělohy a trávicího ústrojí.

**Klinické využití:** Nelze využít pro screening a stanovení diagnózy. Koncentrace CYFRA 21-1 obvykle koreluje se stadiem onemocnění. Hlavní oblastí využití tohoto markeru je monitorování průběhu karcinomu plic, především monitorování úspěšnosti terapie. Význam má rovněž pro sledování nemocných s karcinomem močového měchýře, s nádory v oblasti hlavy a krku, s epidermoidními nádory cervixu (spolu s SCCA).

**Maligní onemocnění:** CYFRA 21-1 v séru nemocných s maligním onemocněním má význam především pro sledování průběhu onemocnění a efektu terapie u nemalobuněčného karcinomu plic, pro některé gynekologické nádory, nádory ORL oblasti a močového měchýře.

**Benigní onemocnění:** CYFRA 21-1 v séru – falešně pozitivní hodnoty markeru u nemocných s jaterní cirhózou, s chronickým onemocněním ledvin a astmatem. (Šimíčková a Nekulová, 2004)

#### **2.4.8 hCG (LIDSKÝ CHORIOGONADOTROPIN)**

**Vlastnosti:** hCG je glykoproteinový hormon přítomný v krvi a v moči během těhotenství. Molekula hCG je tvořena dvěma podjednotkami alfa a beta, které jsou buď navzájem kovalentně vázané, nebo jsou i volné. Alfa podjednotka je identická s alfa-podjednotkami hormonu stimulujícího folikuly (FSH) a luteinizačního hormonu (LH). Strukturální odlišnosti beta-podjednotek jsou specifické pro jednotlivé hormony a slouží k receptorovému rozpoznání jednotlivých hormonů v cílových tkáních. V krvi a v moči se vyskytuje intaktní molekula, alfa a beta podjednotky, štěpné produkty beta-podjednotky (free-beta a beta-core).

**Biologický poločas:** Aktivní hormon má poločas 40 hodin, volná alfa-podjednotka 1,5 hodiny, volná beta-podjednotka 1 hodinu, beta-core fragment do 10 minut.

**Výskyt:** Fyziologicky je lidský choriový gonadotropin syntetizován placentou ihned po početí. Koncentrace v mateřské krvi narůstají. Mezi 14-18 týdnem se jeho koncentrace ustalují a po porodu klesají na normu.

**Fyziologická funkce:** Fyziologicky je produkován trofoblastem a placentou s maximem v 10. – 12.týdnu těhotenství. Jeho funkcí je udržovat žluté tělísko, stimulovat tvorbu progesteronu, inhibičním efektem na T-lymfocyty podporovat imunotoleranci plodu.

**Klinické využití:** Stanovení hCG se využívá k potvrzení těhotenství, je součástí screeningu vrozených vývojových vad. Screening hCG v séru je vhodný pro monitorování symptomatických osob (při podezření na germinativní nádory varlat).

**Maligní onemocnění:** Zvýšené hladiny u nemocných s maligním nádorovým onemocněním se vyskytují u nádorů trofoblastického nebo germinálního původu, Ca ovarii, Ca dělohy, vaječníků, prsu, jater, tenkého a tlustého střeva.

**Benigní onemocnění:** Zvýšení je pozorováno fyziologicky v těhotenství, u žen v menopauze a s myomem nebo ovariálními cystami. (Valík, 2014)

#### ***2.4.9 ICTP (C terminální peptid kolagenu I)***

**Vlastnosti:** ICTP je karboxyterminální telopeptidový úsek kolagenu I provázaný prostřednictvím pyridinolinových vazebných spojek a uvolňovaný během degradace kolagenu typu I. Specifický marker patologické kostní degradace. U patologických stavů spojených s lokální kostní degradací se na resorpci kolagenu podílí jako mediátor zejména enzym matrix metaloproteinasa 9 (MMP9). Produktem této resorpce jsou větší peptidické fragmenty, jako je ICTP (malé peptid. fragmenty vznikají při normálním kostním obratu).

**Fyziologická funkce:** Hodnota ICTP není ovlivněna hormonálními změnami v menopauze či chemoterapií. Hladina se zvyšuje u vznikajících metastáz i tehdy, když se ještě zobrazovacími metodami nedají prokázat.

**Klinické využití:** Je citlivým markerem pro monitorování účinnosti terapie. U kompletní remise zůstává hodnota ICTP v normě.

**Maligní onemocnění:** Zvýšené koncentrace ICTP v séru se vyskytuje při stavech spojených se zvýšenou osteolýzou. (např.: u mnohočetného myelomu, kostních metastáz). Hladiny ICTP se zvyšují s progresí kostních metastáz (karcinom prsu, plic, prostaty).

**Benigní onemocnění:** Revmatoidní artritida, dlouhodobé znehybnění.



#### **2.4.10 PSA (PROSTATICKÝ SPECIFICKÝ ANTIGEN)**

**Vlastnosti:** Prostatický specifický antigen je jednořetězový glykoprotein (obsahuje 90 % proteinu a 10 % sacharidu) s molekulovou hmotností 30-34 kDa., který vykazuje enzymatickou aktivitu. Působí jako serinová proteáza složená z 240 aminokyselin v jednoduchém polypeptidovém řetězci. Tvoří se v epitelu prostaty u zdravých osob, ve zvýšené míře u nemocných s hyperplazií a s karcinomem prostaty.

**Biologický poločas:** 2-3 dny

**Výskyt:** Vyskytuje se ve volné formě (volné PSA, FPSA) a ve formě komplexů (alfa-2-makroglobulinem PSA-AMG a s alfa-1-antichymotrypsinem PSA-ACT). Fyziologicky je produkován v epitelových buňkách žlázových vývodů.

**Fyziologická funkce:** Hlavní funkcí PSA je proteolytické štěpení proteinů tvořících gel ve spermatu, čímž způsobuje jeho ztekucení.

**Klinické využití:** Hlavní využití má PSA při monitorování pacientů s karcinomem prostaty. Stanovení PSA se uplatňuje jako pomocný faktor i při stagingu karcinomu prostaty. Význam screeningu karcinomu prostaty pomocí sérového PSA u asymptomatických mužů není dosud potvrzen, lze jej provádět u starších mužů s příznaky poruch močových cest, ev. s rodinnou zátěží. Pro odlišení benigní hyperplazie od karcinomu se stanovuje poměr volného a celkového PSA (u hyperplazie má vyšší hodnotu o 15 %). U karcinomu prostaty je poměr výrazně nižší. PSA je marker první volby pro sledování průběhu a účinku terapie maligního karcinomu prostaty. Po radikální prostatektomii zvýšené hodnoty PSA značí možnost zbytkové nemoci v 70 % nebo návrat nemoci v 30 %. Hodnota PSA koreluje s účinností léčebné terapie např.: radioterapie. Pokles PSA dobře koreluje s délkou přežití pacienta. Hodnotu PSA lze též využít pro potvrzení stádia onemocnění u 95 % metastatických nádorů. PSA se účastní vazby steroidních hormonů (zejména progesteronu, estrogeny neváže), a proto se zřejmě nachází PSA i v cytosolu nádoru a v krevním séru některých žen s nádorem prsu.

**Maligní onemocnění:** Zvýšené hladiny u nemocných s maligním nádorovým onemocněním se vyskytují u karcinomu prostaty, plic, prsu, nadledvin a kolorektálního karcinomu.

**Benigní onemocnění:** Zvýšení je pozorováno u benigní hyperplazie prostaty nebo prostatitidy, po mechanickém dráždění prostaty (jíзда na kole, koni, vyšetření per rectum). (Čermáková et al., 2005)

#### **2.4.11 NSE (NEURONSPECIFICKÁ ENOLÁZA)**

**Vlastnosti:** NSE je cytoplazmatický, glykolytický izoenzym enolázy (2-fosfo-D-glyceráthydrolyáza, EC 4.2.1.11), který katalyzuje přeměnu 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát). Vyskytuje se jako dimer tvořený ze dvou podjednotek ( $\alpha$  a  $\gamma$ ).

**Biologický poločas:** 1 den

**Fyziologická funkce:** NSE je glykolický enzym podílející se na metabolismu sacharidů.

**Výskyt:** Fyziologicky je produkován v nervové a plicní tkáni vyvíjejícího se plodu a v dospělosti u zdravých osob v různých strukturách neuroendokrinního původu. NSE je přítomna v erytrocytech a krevních destičkách a může se z nich uvolňovat. Proto je nutné krev po odběru co nejrychleji zpracovat a separovat z ní sérum nebo plazmu, aby nedošlo k hemolýze a rozpadu krevních destiček.

**Klinické využití:** Neuronspecifická enoláza je užitečná pro monitorování pacientů s neuroendokrinními nádory, obzvláště s malobuněčným plicním karcinomem a s neuroblastomem. Pro screening a stanovení diagnózy je NSE nevhodná.

**Maligní onemocnění:** Zvýšené hodnoty nalézáme u nádorů mozku (neuroblastomy) a neuroendokrinního původu (feochromocyt), plicního karcinomu. U nádorů CNS se doporučuje stanovit NSE v mozkomíšním moku.

**Benigní onemocnění:** Lze nalézt u nemaligních plicních onemocnění, jaterních chorob a zranění mozku. (Valík, 2014)

#### **2.4.12 ProGRP (ProGastrin-Releasing Peptide)**

**Vlastnosti:** Peptid uvolňující gastrin (GRP) je hormonem produkováným ve střevě, distribuovaným v celé nervové soustavě savců, v gastrointestinálním a dýchacím traktu. Degraduje se přes Pro-gastrin relasing peptid na GRP. Vzhledem ke krátkému biologickému poločasu, bylo vyvinuto stanovení pro-GRP (31-98), který slouží jako

spolehlivý marker u pacientů s malobuněčným karcinomem plic. Pro praktické použití k detekci SCLC se hodí jeho prekurzor – ProGRP.

**Klinické využití:** Peptid ProGRP má význam v diferenciální diagnostice malobuněčných a nemalobuněčných karcinomů plic. Stanovení tohoto markeru má význam pro časnou detekci tumoru u rizikových pacientů. Další využití ProGRP je ve sledování průběhu onemocnění, účinnosti terapie a odhalení recidivy. (Schneiderka et al., 2000)

#### **2.4.13 S-100 (Protein)**

**Vlastnosti:** Protein S-100 je kalcium vážící protein izolovaný z buněk neuroektodermálního původu. Termolabilní kyselý protein o molekulové hmotnosti 21kDa. S-100 A1(alfa) a S100B (beta) byly prvními popsány zástupci původně izolovanými jako nerozdělená směs Moorem z hovězího mozku a pojmenovaná S-100 podle jejich rozpustnosti v 100% roztoku sulfátu amonného. Je tvořen 21 typy monomerů se specifickým výskytem v různých tkáních. Vyskytuje se jako homodimer nebo heterodimer tvořený z podjednotek alfa a beta.

**Biologický poločas:** Není znám

**Fyziologická funkce:** Vzhledem ke schopnosti vázat kalcium se předpokládá jeho spoluúčast na tvorbě struktur mikrotubulů.

**Výskyt:** S-100 protein byl poprvé popsán v centrálním nervovém systému. V nervové tkáni (v gliových a Schwannových buňkách) se především nachází S-100 B (dimer beta-beta). Složení alfa-alfa mají např.: příčně pruhované svaly.

**Klinické využití:** Charakteristickým obsahem beta podjednotky tohoto proteinu jsou melanomy. Přítomnost S-100 v séru svědčí pro výraznou invazivitu melanomu. Pro screening a diagnostiku není vhodný, využívá se pro monitorování nemocných s melanomem.

**Maligní onemocnění:** Senzitivita při metastatickém procesu je vysoká až 80 %. Pozitivní hodnoty lze nalézt i u mozkových maligních nádorů ektodermálního původu.

**Benigní onemocnění:** Falešná pozitivita S-100 v séru se nachází u akutního poškození mozku, zánětlivých a infekčních onemocnění. (Dastyh et al., 2011)

## Tumorové markery

Tabulka č. 1 Tumorové markery

Marker	Stanovení koncentrace tumor markeru	Stabilita			Indikace k vyšetření
		2-8 °C	- 20 °C	15-25 °C	
<b>AFP</b>	Sérum	7 dní	3 měsíce		K monitorování hepatocelulárního karcinomu.
<b>CA 125</b>	Sérum/plazma	5 dní	3 měsíce		K monitorování karcinomu ovárií a gynekolog. nádorů, screening v případě rodinné predispozice.
<b>CA15-3</b>	Sérum/plazma	5 dní	3 měsíce		K monitorování karcinomu prsu. Není vhodné pro screening ani určení diagnózy.
<b>CA 19-9</b>	Sérum/plazma	30 dní	3 měsíce		K monitorování karcinomu jater, žlučníku, trávicího ústrojí. Není vhodné pro screening ani určení diagnózy.
<b>CA 72-4</b>	Sérum/ plazma	30 dní	3 měsíce		K monitorování karcinomu žaludku. Není vhodné pro screening ani určení diagnózy.
<b>CEA</b>	Sérum/ plazma				K monitorování kolorektálního karcinomu, doplňkový marker pro většinu dalších onkologických onemocnění. Není vhodné pro screening ani určení diagnózy
<b>CYFRA 21-1</b>	Sérum/ plazma	7 dní	6 měsíců		K monitorování karcinomu plic. Není vhodné pro screening ani určení diagnózy.
<b>NSE</b>	Sérum	24 hod	3 měsíce	6 hod	K monitorování karcinomu plic. Není vhodné pro screening ani určení diagnózy.
<b>S100</b>	Sérum	2 dny	3 měsíce	8 hod	K monitorování maligního melanomu. Není vhodné pro screening ani určení diagnózy.
<b>ICTP</b>	Sérum	5 dní			K monitorování mnohočetného myelomu, kostních metastáz, revmatoidní artritidě a při dlouhodobém znehybnění.
<b>proGRP</b>	Sérum/plazma	3 dny	12 týdnů		K monitorování karcinomu plic.
<b>PSA</b>	Sérum/plazma	5 dní	6 měsíců		K monitorování karcinomu prostaty. Pro screening karcinomu prostaty, který ovšem musí být potvrzen biopsií.
<b>hCG</b>	Sérum/plazma	3dny	12 měsíců		K monitorování symptomatických osob, tj. při podezření na germinativní nádory varlat.

Zdroj: vlastní zpracování

### **3 CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY**

#### Cíl

1. Popsat používané tumorové markery na OKB Nemocnice Pelhřimov, p. o., metody jejich stanovení včetně analytických parametrů, preanalytické požadavky.
2. Hodnocení výsledků vyšetření tumor markerů.

#### Hypotéza

1. Předpokládá se, že počet vyšetření na OKB Nemocnice Pelhřimov, p. o. bude stoupat.
2. Lze předpokládat, že jednotlivé tumor markery správně zobrazují stav pacienta.

## 4 METODIKA A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ ODDĚLENÍ KLINICKÉ BIOCHEMIE NEMOCNICE PELHŘIMOV, p. o.

### 4.1 *Metody stanovení nádorových markerů*

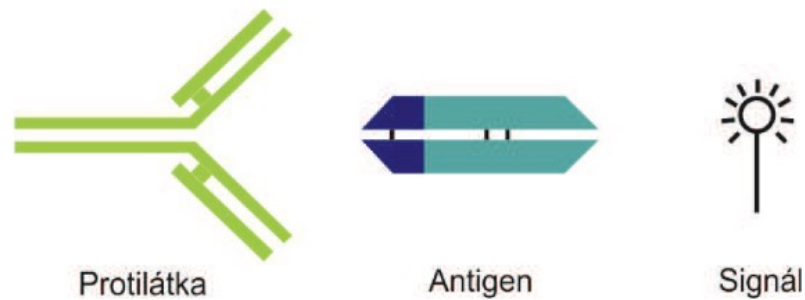
Pro stanovení koncentrace nádorových markerů jsou používány metody imunochemické analýzy. Principem těchto reakcí je vazba mezi antigenem (nádorovým markerem) a specifickou protilátkou. Reakce probíhá v tekutém prostředí nebo v prostředí gelu. Antigeny bývají navázány na nejrůznější nosiče (skleněné, latexové, stěny zkumavek nebo stěny jamek polystyrenových mikrotitračních destiček). Předností imunoanalytických metod je jejich vysoká citlivost a přesnost. Ke stanovení nádorových markerů se ve většině případů odebírá srážlivá krev. Vlastní analýza se provádí ze séra, které je možné skladovat 24 hodin v lednici při teplotě 2-8 °C. Pro delší dobu skladování je nutné sérum zmrazit na -20 °C. (Slavětínská, 2017)

### 4.2 *Antigeny*

Antigeny jsou makromolekulární látky přirozeného nebo syntetického původu, které imunitní systém rozeznávají jako cizí a reagují na ně. Z chemického hlediska mohou být antigeny všechny biopolymery složené z proteinů, polysacharidů, glykoproteinů, lipoproteinů, nukleoproteinů a hormonů. Jejich přítomnost v organismu stimuluje tvorbu protilátek a navozuje imunitní odpověď. Vzhledem ke své funkci může být antigen kompletní nebo nekompletní. Kompletní antigen nazýván též imunogen je makromolekulární látka schopna navodit nejen specifickou imunitní odpověď – imunogenicitu, která zahrnuje tvorbu protilátek a schopnost s protilátkami a lymfocyty reagovat – specifčnost. Imunogen reaguje jen s těmi látkami, jejichž tvorbu vyvolal, což je dáno specifitou této reakce. Nekompletní antigen zvaný haptén, má tak malou molekulu, že je schopen specifické reakce na protilátky, ale nedokáže imunitní odpověď vyvolat. Typickými haptény jsou některá léčiva, resp. jejich metabolity, které vznikají při odbourávání původní látky. Každý imunogen se skládá z makromolekulárního nosiče a nízkomolekulárních determinatních skupin, které se nazývají epitopy. Epitopy představují specifickou oblast antigenu, na kterou se váží protilátka. Představuje určitou skupinu atomů na povrchu antigenu a charakterizuje jeho specifitu a schopnost reagovat s vazebným místem protilátky. Vzhledem ke svému původu můžeme antigeny rozdělit na přirozené a syntetické. Přirozené antigeny jsou cizorodé látky z vnějšího prostředí, tzv. exoantigeny, které tvoří především mikroorganismy. Tyto makromolekulární sloučeniny

jsou obsaženy v bakteriální stěně. Antigeny vlastního organismu tvoří tzv. endoantigeny, které organismus toleruje. Za určitých podmínek se mohou stát imunogenními, a tak vyvolat imunitní reakci namířenou proti vlastním strukturám. (Bartůňková et al., 2011)

Obrázek 3 Schéma hlavních komponent imunoanalýzy

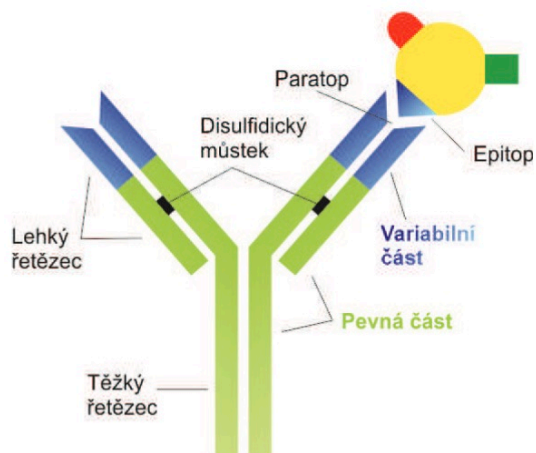


Zdroj: KARLÍKOVÁ, Marie a TOPOLČAN Ondřej, 2013. *Principy imunoanalytických metod pro medicínu*

### 4.3 Protilátky

Protilátky jsou látky bílkovinného charakteru **zvané imunoglobuliny**. V průběhu specifické imunitní odpovědi jsou produkovány plazmatickými buňkami. Tyto plazmatické buňky vznikají z B-lymfocytů. Každá molekula imunoglobulinu obsahuje nejméně jednu základní jednotku tzv. monomer. Monomer se skládá ze dvou identických lehkých (L) a dvou identických těžkých (H) řetězců spojených disulfidickými můstky. Řetězce jsou prostorově uspořádány do tzv. domén. První doména těžkého a lehkého řetězce je variabilní (V) sloužící jako vazebné místo pro antigen. Zbývající část molekuly je pro všechny imunoglobuliny relativně konstantní (C). „Nožičku“ imunoglobulinu tvoří 2 těžké řetězce označované jako Fc fragment. Každé ze dvou „ramének“ je tvořeno lehkým a těžkým řetězcem. Tyto části imunoglobulinu se nazývají „antigen vazající fragmenty“ – Fab fragment. Molekula imunoglobulinu má tvar písmene Y. Lehké a těžké řetězce se liší počtem aminokyselin i molekulovou hmotností. Existují dva typy lehkých řetězců kappa a lambda. Na základě struktury těžkých řetězců se imunoglobuliny dělí do 5 tříd – IgG, IgA, IgD, IgE, IgM. Význam imunoglobulinů spočívá v jejich protilátkové a biologické aktivitě, která umožňuje obranu organismu před cizorodými látkami. (Karlíková a Topolčan, 2013; Bartůňková et al., 2011)

Obrázek 4 Schéma protilátky s navázaným antigenem



Zdroj: KARLÍKOVÁ, Marie a TOPOLČAN, Ondřej, 2013. *Principy imunoanalytických metod pro medicínu*

Protilátky se dělí na polyklonální a monoklonální.

#### 4.3.1 Polyklonální protilátky

Polyklonální protilátky lze charakterizovat jako nehomogenní směs protilátek různé afinity a specifity vytvořené v organismu po vpravení cizorodého imunogenu. Přípravují se poměrně jednoduchou procedurou imunizací zvířat, obvykle opakovaným intravenózním podáváním antigenu (nejčastěji lidské sérum). Potom se provede odběr krve a získá se sérum bohaté na protilátky, nazývané antisérum. Jsou vždy směsí různých protilátek proti jednotlivým vazebným místům nebo epitopům antigenu. Kompletní antigeny obsahují více epitopů a v organismu aktivují několik klonů B – lymfocytů. Během imunizace v krevním séru zvířete vzniká směs protilátek proti různým epitopům použitého antigenu nazývaní se polyspecifické protilátky. Pokud je použit k imunizaci jeden antigen, vytvářené protilátky se nazývají monospecifické. Předností polyklonálních protilátek je jejich vysoká citlivost a vyšší vazebná energie mezi celou molekulou antigenu a protilátky. Nevýhodou jsou velké rozdíly v kvalitě protilátek vlivem individuální imunologické odpovědi.

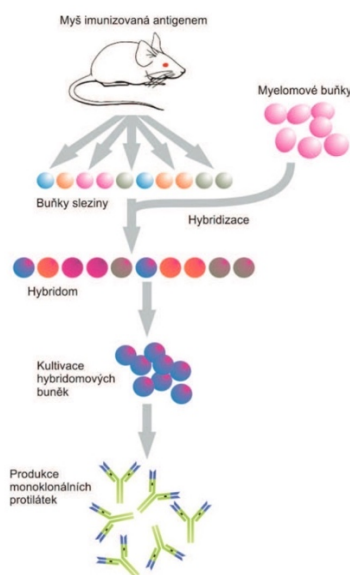
#### 4.3.2 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky jsou produkcí jednoho klonu B-lymfocytů, resp. z uměle připravených buněk vzniklým spojením příslušným lymfocytů s nádorovou buňkou, která jim poskytuje nesmrtelnost. Využívají se v diagnostice a léčbě rakoviny. U pacientů



mohou však vyvolat imunitní odpověď – produkci anti-myších neboli protilátek HAMA (Human – Anti – Mouse – Antibodies), která vede k falešně pozitivním, případně falešně negativním výsledkům u imunoanalytických stanovení. Protilátky jsou homogenní s jasně definovanou specificitou. Tyto protilátky nejsou produkovány přímo organismem, ale buněčnou kulturou. Vyrábějí se z tzv. hybridomu, podstatou je buněčná fúze nádorových buněk s lymfocyty sleziny imunizovaných myší. Nádorový plazmocytyt dodá hybridomu nesmrtelnost a schopnost produkce protilátky jednoho izotopu. Lymfocyt dodá specifitu vůči určitému antigenu. Takto získané protilátky se používají při určování různých součástí séra. Používají se v diagnostice nádorů a při typizaci leukémií.

Obrázek 5 Příprava monoklonálních protilátek



Zdroj: KARLÍKOVÁ, Marie a TOPOLČAN, Ondřej, 2013. *Principy imunoanalytických metod pro medicínu*

#### 4.4 Interakce antigen-protilátka

Podstata všech imunochemických reakcí je založena na vztahu antigen-protilátka. Při reakci antigen – protilátka vzniká imunokomplex. Na tvorbě imunokomplexu se podílejí 3 základní faktory: antigen, protilátka a prostředí.



Mezi protilátkou a antigenem vznikají nekovalentní vazby. Při vzniku vazeb se uplatňuje několik druhů slabých sil, iontové a vodíkové vazby, hydrofobní interakce, disperzní (van der Waalsovy) síly a prostorové odpudivé síly. Intenzitu interakce mezi vazebným místem protilátky (paratopem) a antigenní determinantou vyjadřuje afinita. Afinita

vyjadřuje energii vazby mezi jedním vazebným místem na protilátce a příslušným epitopem na antigenu. Avidita vyjadřuje celkovou energii vazby mezi protilátkou a antigenem. Je dána součtem vazebných afinit všech jednotlivých vazebných míst na protilátce se všemi odpovídajícími epitopy na antigen. Výsledná avidita je mnohem vyšší než pouhý součet afinit jednotlivých protilátek. Při tvorbě imunokomplexů reakcí antigenu a protilátky se mohou vyskytovat sekundární jevy, jako jsou zkřížené reakce (reakce protilátky), jejíž tvorbu vyvolal určitý antigen s jiným antigenem, který má stejné nebo podobné antigenové determinanty jako antigen původní. Zkřížené reakce se vyskytují mezi sacharidovými antigeny, mají podobnou chemickou strukturu. Mezi základní imunochemické reakce patří reakce precipitační a aglutinační. Precipitace je reakce rozpustného antigenu s rozpustnou protilátkou za vzniku precipitátu (sraženiny). Aglutinace je reakce protilátky s nerozpustným antigenem, vedoucí ke vzniku viditelných shluků antigenu.

#### **4.5 Imunoanalytické metody**

Nádorové markery se stanovují imunoanalytickými metodami, jako je radioimunologická analýza (RIA), imunoradiometrická analýza (IRMA), enzymová imunoanalýza (ELISA). Dále se používají automatizované imunoanalytické systémy, které využívají uvedené metody značení, nebo fluorescenční či chemiluminiscenční značky. Antigen nebo protilátka mohou být značeny radioizotopem (radioimunoanalýza), enzymem (enzymová imunoanalýza), fluorescenční nebo chemiluminiscenční látkou (fluorescenční nebo chemiluminiscenční imunoanalýza).

Imunoanalytické metody můžeme rozdělit podle uspořádání reakce na kompetitivní (soutěživá) imunoanalýza a nekompetitivní (nesoutěživá, sendvičová) imunoanalýza, podle prostředí na heterogenní a homogenní metody.

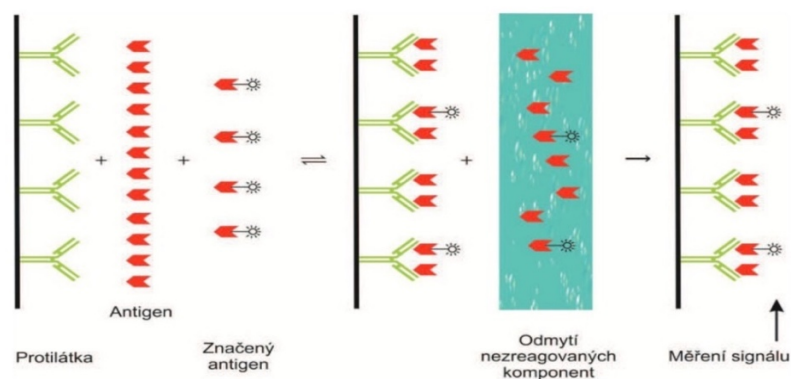
##### **4.5.1 Kompetitivní (soutěživé) metody**

U kompetitivních (soutěživých) metod jsou v reakci přítomny:

- stanovovaný antigen
- stejný antigen, značený markerem
- specifická protilátka proti stanovovanému antigenu v limitovaném množství

U kompetitivních metod je specifická protilátka (Ab) proti stanovovanému antigenu v reakci přítomna v limitovaném množství. O vazebná místa na specifické protilátce mezi sebou soutěží značený a neznačený antigen. Oba antigeny mají stejnou schopnost se navázat na protilátku. Obě formy antigenů se na protilátku navážou v poměru svých koncentrací. Vzniknou imunokomplexy obsahující značku a imunokomplexy bez značky. V reakční směsi zůstane určitý podíl volných antigenů značených i neznačených. Čím je koncentrace stanovovaného antigenu vyšší, tím více vznikne imunokomplexy bez značky. Po skončení reakce měříme podle typu značkovacího markeru, značeného imunokomplexu nebo značeného volného antigenu. Kompetitivní metody jsou jednoduché, rychlé. Nevýhodou je nižší citlivost i specifita. Analýzy se provádějí u menších molekul.

Obrázek 6 Princip kompetitivní imunoanalýzy



Zdroj: KARLÍKOVÁ, Marie a TOPOLČAN, Ondřej, 2013. *Principy imunoanalytických metod pro medicínu*

#### 4.5.2 Nekompetitivní (nesoutěživé) metody – sendvičová technika

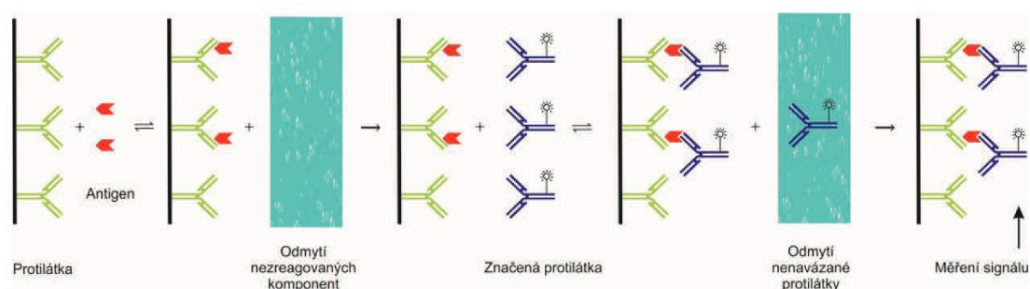
U nekompetitivní metody jsou v reakci přítomny:

- stanovovaný antigen
- protilátka navázaná v přebytku na pevnou fázi – tzv. první protilátka
- druhá protilátka proti stanovovanému antigenu značená markerem

Stanovovaný antigen ze vzorku reaguje se dvěma protilátkami, které jsou v reakční směsi v přebytku. Jedna protilátka bývá značená, druhá protilátka je navázaná na pevnou fázi umožňuje separaci vznikajícího imunokomplexu. Pevnou fází je obvykle vnitřní stěna polystyrenové zkušební desky nebo mikrotitrační destičky. Potom se přidá v nadbytku druhá,

značená protilátka, která se naváže na jiné vazebné místo antigenu v imunokomplexy. Následuje inkubace a promytí, odstraní se nezreagovaná značená protilátka. Podle typu značkovacího markeru se přímo měří radioaktivita nebo enzymová aktivita značeného imunokomplexu, je přímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu. Nekompetitivní metody jsou nákladnější, vyžadují dvě protilátky v přebytku. Metoda se používá pro větší molekuly (např. feritin, PSA, S100).

Obrázek 7 Nekompetitivní „two site“ neboli „sandwichová“ imunoanalýza



Zdroj: KARLÍKOVÁ, Marie a TOPOLČAN, Ondřej, 2013. *Principy imunoanalytických metod pro mediky*

#### 4.5.3 Heterogenní metody

Vyžadují separaci volné a vázané frakce indikátoru. Využívané separační techniky by měly splňovat několik základních požadavků:

- kvantitativní oddělení obou frakcí tak, aby jedna (případně obě) mohly být měřeny
- stejná účinnost pro kalibrátory i analyzované vzorky
- dobrá opakovatelnost (tj. přesnost v jednom stanovení) i reprodukovatelnost (mezi jednotlivými analýzami), rychlost, jednoduchost, automatizovatelnost.

#### 4.5.4 Homogenní metody

U homogenních metod produkuje detekovatelný signál samotná imunochemická reakce, není zde potřeba separace volné a vázané frakce indikátoru. Výhodou oproti heterogenním reakcím jsou kratší časy inkubace a jednodušší protokoly.

#### **4.5.5 Radioimunoanalýza (RIA)**

Základem je imunochemická reakce antigenu se specifickou protilátkou, prováděna in vitro v přítomnosti vhodného radionuklidu. Ke značení se používá stálejší radionuklid  $^{125}\text{I}$  s poločasem rozpadu 60 dní a gama zářením s velmi nízkou energií fotonů. Při detekci se měří radioaktivita detektorem záření podle typu značkovacího radionuklidu. Kompetitivní heterogenní radioimunoanalýza může kompletně probíhat v kapalně fázi, nebo s použitím pevné fáze. Značený antigen soupeří o vazebná místa na protilátce, která se v reakční směsi nachází v omezeném množství, s neznačeným antigenem. Po dosažení rovnováhy se pomocí vhodné separační metody oddělí volný antigen od antigenu vázaného protilátkou a určí se aktivita jedné nebo obou frakcí. Předností RIA je vysoká citlivost, specifická, malá spotřeba protilátky a možnost automatizace. Nevýhodou je práce s radioaktivním zářením, nutnost separačního mezistupně.

#### **4.5.6 Imunoradiometrická analýza (IRMA)**

Je nekompetitivní heterogenní imunoanalytická metoda. Stanovení nádorových markerů probíhá pomocí dvou protilátek, z nichž jedna je značena radioizotopem. Imunochemická reakce probíhá mezi stanovovaným antigenem a dvěma protilátkami v nadbytku. Jde o metodu, kdy se na kotvící protilátku (na pevné fázi) naváže stanovovaný antigen, přidává se druhá protilátka (značená  $^{125}\text{I}$ ) v nadbytku. Tento typ metod je označován jako sendvičový.

#### **4.5.7 ELISA (Enzyme – Linked ImmunoSorbent Assay)**

Jedna z nejpoužívanějších bioanalytických metod, vzhledem k její specifitě, jednoduchosti a snadné automatizovatelnosti. Metoda ELISA je založena na specifické interakci antigenu s příslušnou protilátkou. Využívá enzymů ke značení antigenu nebo protilátky. Jako enzymová značka slouží peroxidasa nebo alkalická fosfatasa. Elisa metody lze rozdělit na heterogenní (vyžadující separaci volné a vázané frakce analytu) a homogenní, které nevyžadují separaci. Heterogenní enzymová imunoanalýza je metoda, kdy stanovujeme množství antigenu nebo protilátky. Antigen nebo protilátka jsou pevně zakotveny na pevné fázi, kterou může být buď povrch mikrotitračních jamek, zkumavky a magnetické částice. Uspořádání může být kompetitivní i nekompetitivní. Kompetitivní uspořádání (se značenou protilátkou, nebo značeným antigenem), nebo nekompetitivní

(se značenou protilátkou). Homogenní metody jsou velice jednoduché, mají menší citlivost než heterogenní metody.

#### **4.5.8 Elektrochemiluminiscenční metoda**

Chemiluminiscenční reakce je vyvolána elektricky, vložením napětí na imunologické komplexy. Metodika využívá protilátky značené ruthenium-tris bipyridylovým komplexem, resp. jeho ester  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]$  N-hydroxysukcinimid, který se snadno váže na aminoskupiny bílkovin, haptenu a nukleových kyselin. Druhá elektrochemicky aktivní složka je tripropylamin (TPA). Reakce rutheniového komplexu a TPA probíhá na povrchu platinové elektrody. Zde je TPA oxidován, uvolňuje elektron a přechází na nestabilní kation radikálu TPA, odštěpením protonu ( $\text{H}^+$ ) se mění na radikál TPA. Rutheninový kationt prochází reakcí cyklicky, nespotřebovává se, chová se jako enzym. TPA se rozpadá na dipropylamin, v reakci je spotřebováván a slouží jako substrát. Antigen, protilátka se vazbou streptavidin-biotin pevně navážou na magnetické polystyrenové mikročástice. Použitím mikročástic je dosaženo velké reakční plochy pro imobilizaci imunologických reaktantů. Mikročástice jsou rozptýleny v roztoku. Po skončení inkubace se reakční směs nasaje do průtokové kyvety, kde je umístěn elektromagnet. Všechny magnetické mikročástice s navázanými imunoreaktanty jsou magnetem přitaženy (všechny nenavázané částice projdou, není třeba proplachovat během inkubace. Po propláchnutí kyvety se nasaje substrát TPA. Vlastní chemiluminiscence je zahájena přivedením elektrického napětí do roztoku vzorku, což umožňuje jednoznačně řízenou a velmi dobře reprodukovatelnou reakci. Jednotlivé reakce mohou probíhat v kompetitivním nebo nekompetitivním uspořádání. Přístroj využívá kazetové reagentie, identifikace pacientů a detektor sraženiny (reagentií pomocí čárových kódů). Výhodou ECLIA je vysoká citlivost, rychlá doba analýzy a malé množství vzorku potřebného k analýze.

#### **4.6 Možnosti využití tumor markerů v klinické praxi**

Nádorové markery se v klinické praxi využívají v následujících případech.

**Screening** – K poměrně nízké senzitivitě a specificitě není většina nádorových markerů vhodná pro screening. Aby byl marker vhodný pro screening musel by mít 95% specificitu a alespoň 90% senzitivitu. Těmito kritériím většina markerů nevyhovuje.

Příčinou je pomalé pronikání nádorových markerů do tělesných tekutin, které snižuje senzitivitu testů. (Valík, 2014)

**Primární diagnostika** – Nádorové markery pro primární diagnostiku nejsou optimální podobně jako pro screening, vzhledem k nízké senzitivě a specificitě. Jsou zvýšeny jak u benigních nádorů dané lokalizace, tak i při generalizaci. (Exkschlager a Průša, 2002)

**Rozsah onemocnění** – Vysoká hodnota nádorového markeru v séru může upozornit na nesprávně určené nižší stadium choroby (např. susp. generalizace u hodnot PSA >100 $\mu$ g/l. (Valík, 2014)

### **Monitorování průběhu terapie**

Markery se výborně uplatňují při sledování průběhu onemocnění s cílem diagnostikovat recidivu nebo progresi onemocnění. Hlavní význam je především ve sledování nádorových markerů tam, kde časná diagnostika recidivy umožní optimalizaci léčby, nebo změnu kvality života nemocného. Naopak u nádorů s nepříznivou prognózou, je sledování markerů po provedeném chirurgickém zákroku bezcenné. Sledování nádorových markerů nemá smysl, pokud jsou vyčerpány všechny léčebné možnosti a k dispozici je pouze symptomatická léčba. Je nutné dodržovat zásadu stanovení optimálního markeru, nebo optimální kombinace markerů v korelaci s diagnózou. Řada markerů se v průběhu onemocnění mění, jejich změny jsou pro diagnostické použití bezvýznamné. (Kaušitz a et al, 2014)

### **Sledování efektu terapie**

Sledování efektu terapie pomocí nádorových markerů se stále více stává neocenitelným pomocníkem lékaře. Vzhledem k různým biologickým poločasům jednotlivých nádorových markerů je nutno správně volit intervaly odběrů krve k vyšetření tak, aby se zachytil efekt terapie, a ne lysis fenomén, tj. krátkodobý prudký nárůst hladiny markeru jako odpověď na terapii. Pro sledování účinnosti léčby je důležité stanovit hodnoty nádorového markeru před zahájením léčby. Pro posouzení úspěšnosti terapie vyšetřujeme nádorové markery nejdříve koncem třetího týdne, lépe ve 4. týdnu od aplikace terapie. Cílem co nejpřesnějšího sledování účinnosti ordinované léčby je určovat hladiny alespoň dvou nádorových markerů, které ukazují na dynamiku různých biologických procesů v nádoru. Nejvhodnější je kombinace markerů, z nichž jeden koreluje s velikostí tumoru a druhý ukazuje na změny růstové aktivity nádoru. Správně zvolená efektivní léčba je

taková, kdy po 2. měsících její aplikace poklesnou hladiny markeru pod 50 % hodnoty naměřené před zahájením léčby. (Cibula et al., 2009)

### **Frekvence vyšetření**

Pro frekvenci vyšetřování platí kritéria doporučená WHO. Podle zkušeností kliniků i statistiků hodnotících dynamiku změn nádorových markerů ve vztahu ke klinickému průběhu choroby je třeba dodržovat doporučenou frekvenci vyšetření. Je vhodné vyšetřit hladinu nádorových markerů před chirurgickým výkonem, k posouzení radikalitu výkonu při měření hladin markeru po výkonu. (Valík, 2014)

### **Frekvence vyšetřování nádorových markerů**

*Tabulka 1 Frekvence vyšetřování nádorových markerů*

Před terapií - chirurgický výkon, chemoterapie, radioterapie	Výběr 1-2 NM
Po terapii	Dle biologického poločasu 1-5 týdnů
Do 6 měsíců po terapii	1x měsíčně
6-12 měsíců po terapii	1x za 2 měsíce
12-18 měsíců po terapii	1x za 3 měsíce
Po 18 měsících	1x za 6 měsíců
Mimořádné vyšetření NM	Při nejasném průběhu nemoci Při nález 2. stoupající hladiny opakování vyšetření do 1 měsíce

Zdroj: VALÍK, D., 2014. *Doporučení k využití nádorových markerů v klinické praxi* [online]. 2014.

#### **4.7 Charakteristika pracoviště OKB Nemocnice Pelhřimov**

Oddělení klinické biochemie je součástí laboratorního komplementu zdravotnického zařízení Nemocnice Pelhřimov. Úkolem oddělení je provádění biochemických vyšetřování různých biologických materiálů. Jedná se o základní a specializovaná biochemická vyšetření, statimová i rutinní pro Nemocnici Pelhřimov, ordinace odborných lékařů a soukromé ordinace praktických lékařů ve spádové oblasti. Vzhledem k tomu, že nemocnice poskytuje ambulantní i lůžkovou péči, zajišťuje OKB nepřetržitý provoz. Laboratoř klinické biochemie se průběžně připravuje na akreditaci dle normy ČSN EN ISO 15189. OKB získalo v listopadu 2017 akreditaci MZČR pro vzdělávání v oboru klinická biochemie. Kvalita práce v laboratoři je zajišťována systémem interní a externí kontroly kvality a dalším vzděláváním všech pracovníků laboratoře.



#### **4.7.1 Podmínky měření nádorových markerů**

Preanalytické a analytické podmínky stanovení nádorových markerů jsou v rutinní klinické praxi důležité. Nádorové markery by měly být stanoveny jednou metodikou, v jedné laboratoři za optimálních podmínek a podle standardních postupů. Měly by být stanoveny v akreditovaných laboratořích, které splňují podmínky interní a externí kontroly. Diagnostické kity od různých výrobců mohou u stejného vzorku vykazovat rozlišné hodnoty stejného nádorového markeru. Pokud je nutné změnit metodiku, delší dobu se provádí stará a nová metodika současně. Obě metodiky je nutné pečlivě pozorovat a korelovat výsledky za účelem minimalizace špatné interpretace výsledků. Rovněž je nezbytná multioborová spolupráce mezi laboratorními pracovníky a kliniky. Jedině tak lze optimálně využít nádorových markerů pro rutinní klinickou praxi.

##### **4.7.1.1 Preanalytické požadavky**

Preanalytický proces můžeme rozdělit na mimolaboratorní a laboratorní. Mimolaboratorní preanalytická fáze zahrnuje přípravu pacienta k odběru biologického materiálu, vlastní odběr, identifikaci biologického materiálu a jeho transport do laboratoře.

Preanalytický proces v laboratoři tvoří příjem a identifikace biologického vzorku při jeho příchodu do laboratoře, datum, místo a čas odběru, číselný kód pracoviště, diagnózy a pojišťovny pacienta. Vložení identifikačních údajů pacienta do LIS. Centrifugace – příprava analytického vzorku, pro biochemickou analýzu se používá krevní sérum nebo krevní plazma. Označení analytického vzorku čárovým kódem a vytvoření alikvotů a jejich označení štítky s čárovým kódem. Roztřídění primárních a sekundárních vzorků. Vzorky krve pro stanovení hladin nádorových markerů se centrifugují při 3500 otáčkách po dobu 5 minut. Pokud se analyt nestanoví ihned, vytvoří se alikvoty, které se namrazí.

U vzorků se sledují tzv. sérové indexy, které hodnotí stav hemolýzy, chylozity a iktericity séra. Silně hemolytické a chylózní vzorky se nevyšetřují. Jedinou výjimkou je stanovení NSE, kde i slabá hemolýza falešně zvyšuje výsledek vyšetření.

##### **4.7.1.2 Analytické požadavky**

Spočívají ve vhodném výběru metody pro stanovení nádorových markerů. Mezi základní analytické vlastnosti patří preciznost, pravdivost, přesnost.

**Preciznost** – vyjadřuje vyhodnocení dopadu existence náhodných chyb při měření, které nelze nikdy eliminovat. Tyto chyby způsobují náhodné vlivy (nestabilita přístrojů, kolísání okolních podmínek měření – teploty, výkyvy v činnosti operátora. Výsledkem jejich působení je vznik rozdílů mezi výsledky opakovaných měření.

**Pravdivost** – vyjadřuje těsnost shody mezi průměrnou hodnotou získanou z velkého počtu výsledků měření a skutečnou hodnotou.

**Přesnost** – jedná se o těsnost shody mezi změřenou a pravou hodnotou měřené veličiny. Tato vlastnost se dotýká jednoho výsledku měření a je aktuálním projevem kombinace preciznosti a pravdivosti metody. (Kušnierová et al., 2014)

#### ***4.7.1.3 Postanalytické požadavky***

Postanalytickým procesem se rozumí validace analytických výsledků, elektronický přenos do laboratorního informačního systému a archivace primárních případně alikvotních vzorků. Biologické vzorky je nutné skladovat při teplotě 4-8°C. Dobu, po kterou je potřeba vzorky skladovat si každé pracoviště volí samo.

### ***4.8 Principy stanovení tumor markeru na analyzátoru Cobas e 601***

#### ***4.8.1 Analyzátor Cobas e 601***

Laboratoř OKB v pelhřimovské nemocnici používá k vyšetření tumor markerů analyzátor Cobas e601 od firmy Roche. Tento plně automatizovaný analyzátor pro heterogenní imunoanalýzu pracuje na základě elektrochemiluminiscenční reakce, tzv. sendvičovým principem založeným na reakci antigenu a protilátky. Elektrochemiluminiscence je velmi citlivá detekční technika dosahující širokého měřicího rozsahu a krátké inkubační doby. Analyzátor Cobas e 601 se skládá z tzv. ovládací konzole, Core jednotky – obslužného modulu a modulu pro heterogenní imunoanalýzu e 601. Nedílnou součástí systému je Cobas link – další počítač, který obsahuje tzv. e – library.

#### ***4.8.2 Přístrojové vybavení analyzátoru Cobas e 601***

Analyzátor Cobas e 601 je plně automatický, softwarově řízený systém pracující pro pacienty. Ovládací konzole se skládá z počítače, dotykové obrazovky, klávesnice, myši a tiskárny. Software pracuje pod Windows XP a je prakticky stejný při různém počtu i typu modulů. Pro vkládání aplikací, kalibrátorů, kontrol slouží Cobas link, z něhož

se potřebné informace přetahují do systému. Díky tomu, že Cobas link je prostřednictvím web tunelu stále propojen se sítí Roche, jsou k dispozici vždy aktuální verze dat. Změny na aktuální databázi Cobas link se provádějí po dvoustupňovém schválení. 1. na úrovni země, 2. na úrovni laboratoře. Znamená to, že o každé změně se jak zastoupení firmy v dané zemi, tak odpovědný pracovník dané laboratoře nejen dozví, ale její aplikaci musí schválit. Přítomnost nových informací či modifikace předchozích je možné najít v položce nové záznamy. Tato skutečnost je také signalizována přímo v softwaru Cobas 6000 a obsluha má tak možnost provést aktualizaci přímo v analyzátoru.

Core jednotka, která je základem každého Cobas 6000, pracuje s 5-ti pozičními stojánky. Do vstupu je možné vložit dva nosiče – každý až s 15 stojánky – tedy až 150 vzorků současně. Statimový vstup slouží pro vkládání stojánků s urgentními vzorky, nebo při napojení na perianalytický systém Cobas connection modules – CCM pro on-line vstup vzorků. V tom případě se potom priorita obou vstupů prohodí. Na vstupu je identifikační jednotka a za ní manipulační kruh pro 20 stojánků. Určitý počet pozic lze vyčlenit pro statimy, resp. pro kontrolní vzorky. Díky tomu je zpracování statimových vzorků skutečně urgentní a stálá dosažitelnost kontrolních vzorků umožňuje automatické zpracování QC.

Modul pro heterogenní imunoanalýzu e 601 obsahuje dvě měřicí komory a má až dvojnásobný výkon tedy 170 testů/hod. Pro jeden test je možno použít jen jednu nebo obě měřicí komory podle frekvence požadavků na příslušný test, čímž je možno snížit náklady na kalibraci a QC. Další důležitou předností tohoto zdvojení cel je možnost okamžité zálohy. Součástí přístroje je reagenční kruh 25 pozic. Prakticky je tedy možno provádět 18-25 různých metod současně. Dále je součástí přístroje inkubátor reakčních kyvet (v reakčním disku je 54 pozic pro kyvety, teplota 37 °C pomocí vzduchové lázně), pipetovací a mycí systém, zásobní stanice pro magazíny a prostor pro pevný odpad. Pro pipetování vzorků se používá špička na jedno použití, aby nedocházelo ke kontaminaci předchozím vzorkem. Špička je vybavena detekcí sraženiny, pěny a hladinovým senzorem. Modul e 601 má navíc tzv. předmycí stanici (PreWash), v které se izolují paramagnetické částice s navázanými imunokomplexy, odstraní se reakční směs a částice se před měřením znovu resuspendují. Tím se odstraní matrix efekt.

Nádobky, v nichž probíhá reakce, jsou též na jedno použití. Dopravníkový systém využívá 5-ti místné stojánky. Identifikace vzorků a reagensů probíhá načtením čárových

kódů. Pipetovací špičky, reagenční nádoby jsou automaticky doplňovány ze zásobníků pomocí robotizovaného ramena. (Roche Diagnostics, 2016)

Obrázek 8 Cobas e601



Zdroj: Roche diagnostic dostupné z [http://www.roche-diagnostics.cz/home/produkty/cobas\\_6000.html](http://www.roche-diagnostics.cz/home/produkty/cobas_6000.html)

#### 4.8.3 *Princip a postup metody*

Stanovovaný marker ve vzorku reaguje se dvěma monoklonálními protilátkami. Jedna protilátka je značena biotinem a druhá rutheniovým komplexem, tvoří se sendvičový imunokomplex. Ve druhé fázi se do reakční směsi přidají mikročástice potažené streptavidinem a dochází k vazbě mezi streptavidinem a biotinem. Reakční směs je nasáta do měřicí cely, kde je imunokomplex zachycen pomocí magnetu na povrchu elektrody. Nenavázané protilátky jsou odstraněny a promyty roztokem ProCell. Jako luminogen je použit komplex ruthenium-bis(bipyridyl) a tripropylamin (TPA). Na povrch platinové elektrody je přivedeno napětí. TPA se oxiduje, uvolňuje elektron. Rutheniový komplex se oxiduje z  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  na  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ , za působení oxidovaného TPA se mění zpět  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  při současném uvolnění fotonu. Světelný tok se proměřuje fotonásobičem a jeho intenzita je přímo úměrná množství ve vzorku.

Příkladem lze uvést stanovení antigenu CA 19-9.

CA 19-9 je nekompetitivní (sendvičová) imunoanalýza. Ke vzorku se přidá biotinylovaná monoklonální protilátka proti CA 19-9 a monoklonální protilátka specifická protilátka proti CA 19-9 značená rutheniovým komplexem – probíhá první inkubace za tvorby sendvičového komplexu. Následuje druhá inkubace – po přidání mikročástic potažených

streptavidinem se komplex váže na pevnou fázi prostřednictvím interakce mezi biotinem a streptavidinem. Reakční směs je nasáta do měřicí cely, kde jsou mikročástice zachyceny magnetickým polem na povrchu elektrody. Nenavázané složky jsou odstraněny roztokem ProCell. Přivedené napětí na elektrodě vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů, která je změřena fotonásobičem. Výsledky jsou hodnoceny z kalibrační křivky. Na sendvičovém principu probíhá měření i ostatních nádorových markerů na Cobas e601.

#### **4.8.3.1 Odběr materiálu**

Odběr krve se provádí standartním způsobem. Stanovení se provádí ze séra, nebo z plazmy – heparin, EDTA. Je možno používat zkumavky se separačním gelem. Vzorek musí být doručen do laboratoře řádně vyplněnou žádankou.

#### **4.8.3.2 Reagencie**

Souprava obsahuje:

- M – mikročástice potažené streptavidinem (průhledné víčko)
- R1 – biotinylovaná monoklonální protilátka daného markeru (šedé víčko)
- R2 – monoklonální protilátka daného markeru značená ruthenioým komplexem (černé víčko)

#### **4.8.3.3 Stručný popis postupu**

Do reakční kyvety se napipetuje určité množství vzorku, biotinylované monoklonální protilátky daného markeru a monoklonální protilátky daného markeru značené ruthenioým komplexem. Reakční směs se inkubuje a vytváří se sendvičový komplex. Dále se přidá reagencie mikročástice potažené streptavidinem a probíhá druhá inkubace. Reakční směs se proměřuje v měřicí cele. Intenzita světelného toku je přímo úměrná koncentraci daného markeru ve vzorku. Výpočet koncentrace se provádí podle kalibrační křivky. Výpočet provádí software přístroje. (Slavětínská, 2017)

### **4.9 Metoda UniQ ICTP RIA**

#### **4.9.1 Princip testu**

Test je založen na technice kompetitivní radioimunoanalýzy. Známé množství značeného ICTP a neznámé množství neznačeného antigenu soutěží o omezený počet vysoce afinitních vazebných míst protilátky. Po separaci volného antigenu je množství

značeného ICTP ve zkumavce nepřímo úměrné množství ICTP ve vzorku. Koncentrace v neznámých vzorcích se odečtou z kalibrační křivky.

#### **4.9.2 Pracovní postup**

Reagencie a vzorky se temperují na laboratorní teplotu (18 – 25°C) alespoň 30 minut před použitím. Označí se sada zkumavek v duplikátech pro nespecifickou vazbu (NSB), kalibrátory, kontroly, vzorky sér pacientů a pro celkovou aktivitu. Do odpovídajících zkumavek se napipetuje po 100 µl kalibrátorů, kontrolních vzorků a vzorků sér pacientů. Do zkumavek pro stanovení nespecifické vazby (NSB) lze pipetovat sérum kteréhokoliv pacienta. Do všech zkumavek se přidá 200 µl radioindikátoru. Do všech zkumavek, kromě NSB a celkové aktivity, se napipetuje 200 µl roztoku protilátky. Do zkumavek určených pro stanovení NSB se přidá 200 µl destilované vody. Obsah zkumavek se důkladně promíchá na vibračním míchadle, zkumavky se překryjí fólií a inkubují se 2 hodiny při teplotě 37 °C. Separální činidlo se nejprve důkladně promíchá šetrným převrácením lahvičky dnem vzhůru, přidá se do všech zkumavek 500 µl, kromě zkumavek s celkovou aktivitou. Obsah zkumavek se důkladně promíchá na vibračním míchadle a inkubuje se 30 minut při pokojové teplotě. Zkumavky se centrifugují 30 minut při nejméně 2000 g při teplotě v rozmezí 4 – 20 °C. Obsahy všech zkumavek vyjma zkumavek pro stanovení celkové radioaktivity se dekantují. Jemně se klepne zkumavkami do buničité vaty a ponechají se několik vteřin odkapat, aby se odstranil i poslední zbytek kapaliny. Měli bychom dát pozor, aby nedocházelo k dekantaci sraženiny. Zkumavky jednou otočené nazpět se již znovu dnem vzhůru neotáčejí. Pokud ve zkumavkách zůstanou zbytky kapaliny, způsobí to rozptyl v hodnotách replikátů a chybné hodnoty. Změří se radioaktivita všech zkumavek pomocí gama-čítače po dobu alespoň 1 minuty nebo po akumulaci 10 000 impulsů/zkumavku.

#### **4.9.3 Specifikace přístroje**

Čítač IMMUNOTECH počítá s vysokou reprodukovatelností fotony záření gama emitovaného zářičem vloženým do prostoru detektoru. Součástí detektoru je studňovitý krystal jodidu sodného aktivovaný thaliem, v němž je foton gama konvertován na světelný impuls, jehož intenzita je úměrná velikosti kvanta fotonu gama. Tento impuls je ve fotonásobiči přeměněn na impuls elektrický, jehož velikost je opět úměrná energii

gama kvanta. Na závěr jsou výsledky odečítány manuálně z kalibrační křivky vynesené v semilogaritmických souřadnicích. (UniQ, 2013)

## 5 Experimentální část

Statistika vyšetření markerů za jednotlivé roky v OKB Nemocnici Pelhřimov, p. o.

Tabulka č. 2 Počet vyšetření markerů v Nemocnici Pelhřimov, p. o.

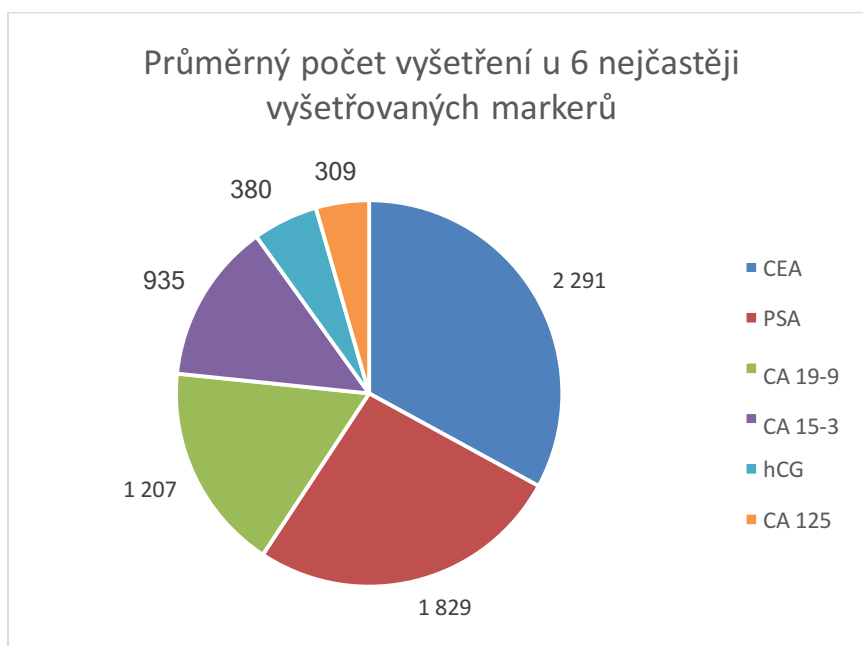
Marker	2015	2016	2017	Průměr
CEA	1 421	2 445	3 007	2 291
PSA	1 234	1 696	2 558	1 829
CA 19-9	871	1 291	1 458	1 207
CA 15-3	409	966	1 429	935
hCG	260	390	490	380
CA 125	316	296	316	309
ICTP	213	250	392	285
CYFRA 21-1	210	222	252	228
S 100	193	217	250	220
Free PSA	0	261	397	219
CA 72-4	205	201	241	216
NSE	163	209	260	211
proGRP	85	82	124	97
AFP	0	64	149	71
Průměrný počet	399	614	809	607

Pozn.: Některé markery (CEA, CA19-9, Ca 15-3, PSA, FPSA, FPSA, AFP) byly vyšetřovány do 3/2016 též na RTO Nemocnice Pelhřimov, p. o., od 4/2016 pouze OKB.

Zdroj: Oddělení klinické biochemie Nemocnice Pelhřimov, p. o.

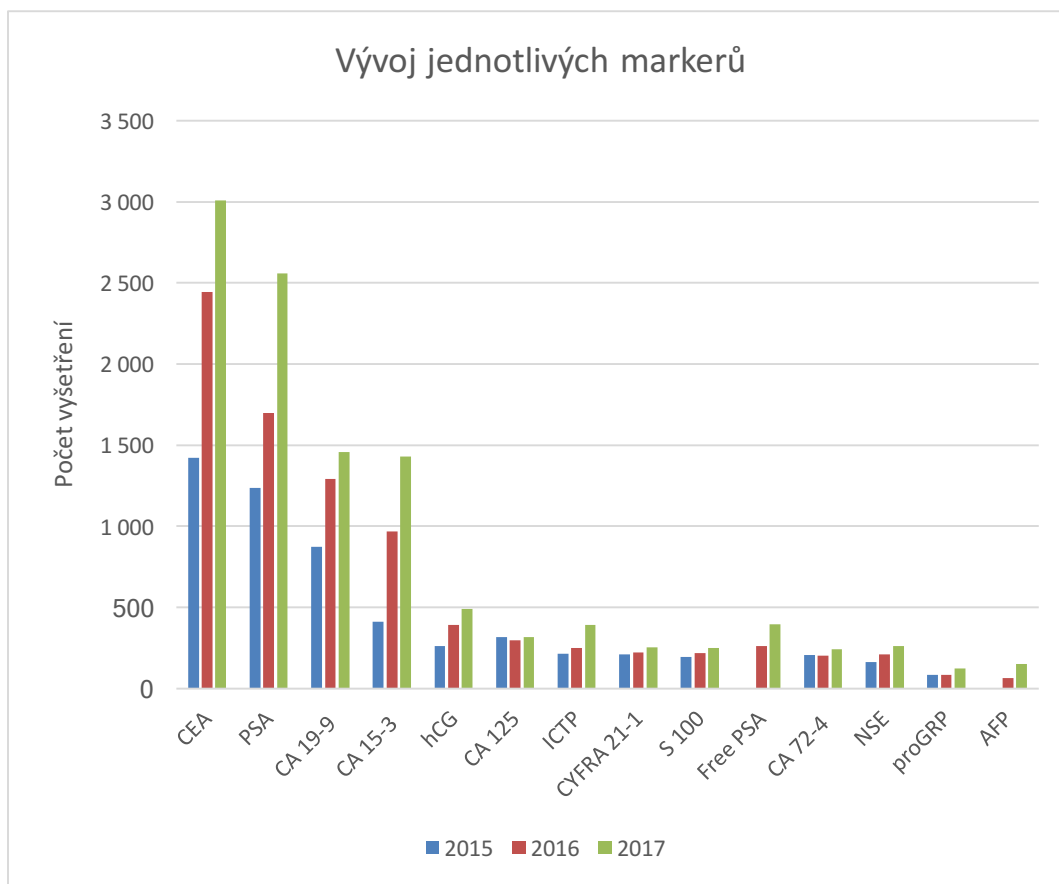


Graf 1 Průměrný počet vyšetření u 6 nejčastěji vyšetřovaných markerů



Zdroj: Vlastní zpracování

Graf 2 Vývoj jednotlivých markerů ve 3 letech



Zdroj: Vlastní zpracování

Referenční hodnoty tumorových markerů OKB Nemocnice Pelhřimov, p. o.

Tabulka č. 3 Referenční hodnoty tumorových markerů OKB Nemocnice Pelhřimov, p. o.

Markery (jednotky)	Referenční rozmezí	
AFP kU/l	Do 5,8	
CA 125 kU/l	Do 35,0	
CA 15-3 kU/l	Do 25,0	
CA 19-9 kU/l	Do 27,0	
CA 72-4 kU/l	Do 6,90	
CEA µg/l	Do 4,7	
CYFRA 21-1 µg/l	Do 3,3	
fPSA/tPSA	Od 25 do 100	
hCG U/l	Muži do 2	Ženy do 7 (netěhotné)
ICTP µg/l	Muži 2,1 – 5,0	Ženy 2,1 – 5,6
NSE µg/l	Do 16,3	
proGRP ng/l	Od 2,0 – do 50,0	
S100 µg/l	Do 0,105	
PSA µg/l	Do 40 let – 1,4 Do 50 let – 2 Do 60 let – 3,1 Do 70 let – 4,1 Nad 70 let – 4,4	

Zdroj: Laboratorní příručka OKB Nemocnice Pelhřimov, p.o.

## PACIENT č. 1

Rok narození 1961, Muž, Dg. C20

- v listopadu 2014 pacientovi zjištěn karcinom konečnicku
- v prosinci byla zahájena chemoterapie a ozáření
- v květnu 2015 hodnoty hraniční, pacient odeslán na CT, kde byly zjištěny metastázy do jater, pacient následně odeslán na chirurgické řešení
- koncem října 2015 ukončena chemoterapie
- po odstranění se markery normalizovaly

CEA – referenční rozmezí do 4,7 µg/l, u kuřáků až do 10µg/l

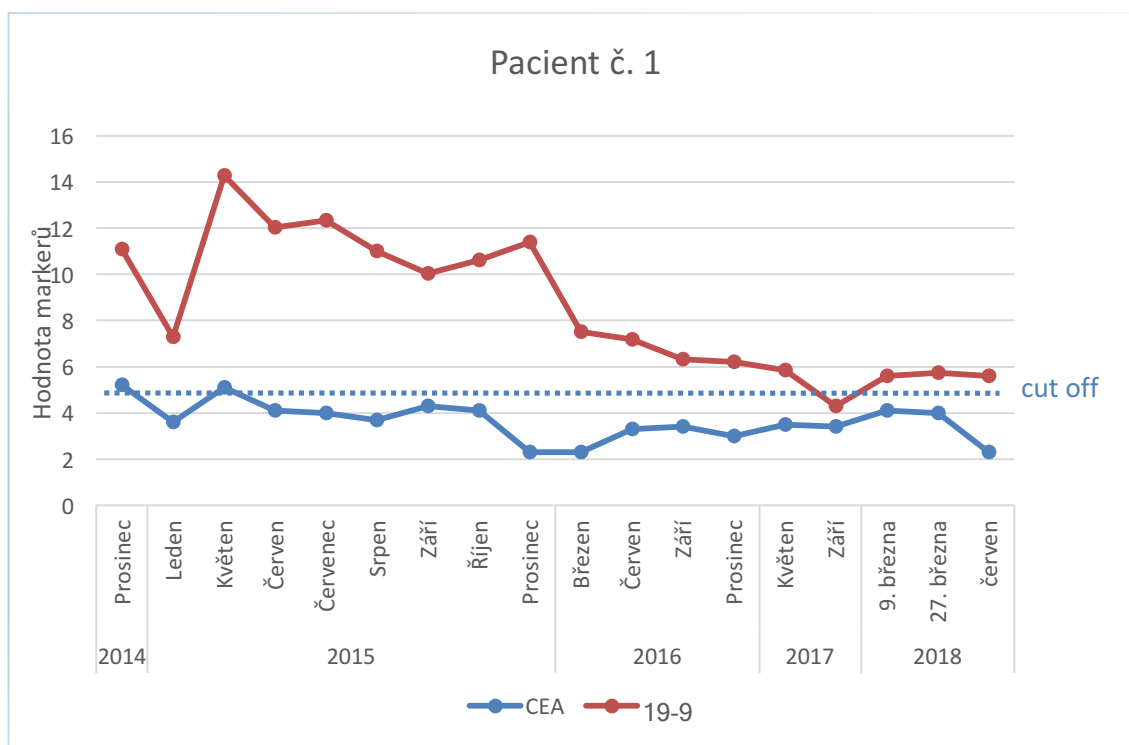
CA19-9 – referenční rozmezí 27 kU/l

Tabulka č. 4 Vyšetření pacienta č. 1

ROK	MĚSÍC	MARKER		LÉČBA-ZÁKROK
		CEA	19-9	
2014	Prosinec	5,2	11,09	chemoterapie / ozáření
2015	Leden	3,6	7,29	
	Květen	5,1	14,28	chirurgický zákrok
	Červen	4,1	12,04	
	Červenec	4	12,34	
	Srpen	3,7	11	
	Září	4,3	10,04	
	Říjen	4,1	10,62	ukončena chemoterapie
	Prosinec	2,3	11,4	
2016	Březen	2,3	7,5	
	Červen	3,3	7,19	
	Září	3,4	6,32	
	Prosinec	3	6,21	
2017	Květen	3,5	5,85	
	Září	3,4	4,3	
2018	9. března	4,1	5,6	
	27. března	4	5,73	
	červen	2,3	5,6	

Zdroj: Oddělení klinické biochemie Nemocnice Pelhřimov, p. o.

Graf 3 Vyšetření pacienta č. 1



Zdroj: Vlastní zpracování

Marker CEA u pacienta odpovídal vývoji nemoci, z toho vyplývá, že byl vhodně zvolen pro diagnostiku. Po odstranění metastáz v játrech hodnoty v normě.

Marker CA19-9 koreloval s vývojem markeru CEA, ovšem jeho hodnoty nepřekročily referenční rozmezí a nezobrazily by vývoj onemocnění správně.

## PACIENT č. 2

Rok narození 1943, Muž, Dg. C61

- pacient sledován pro nádor prostaty
- následně byla zahájena hormonální terapie
- od roku 2016 dochází k progresi onemocnění, objeveno v kostech, zahájena léčba Radium<sup>226</sup>, bez odpovědi
- v říjnu 2017 léčba změněna na X-tandi, následně dochází k poklesu markerů a léčba stále probíhá

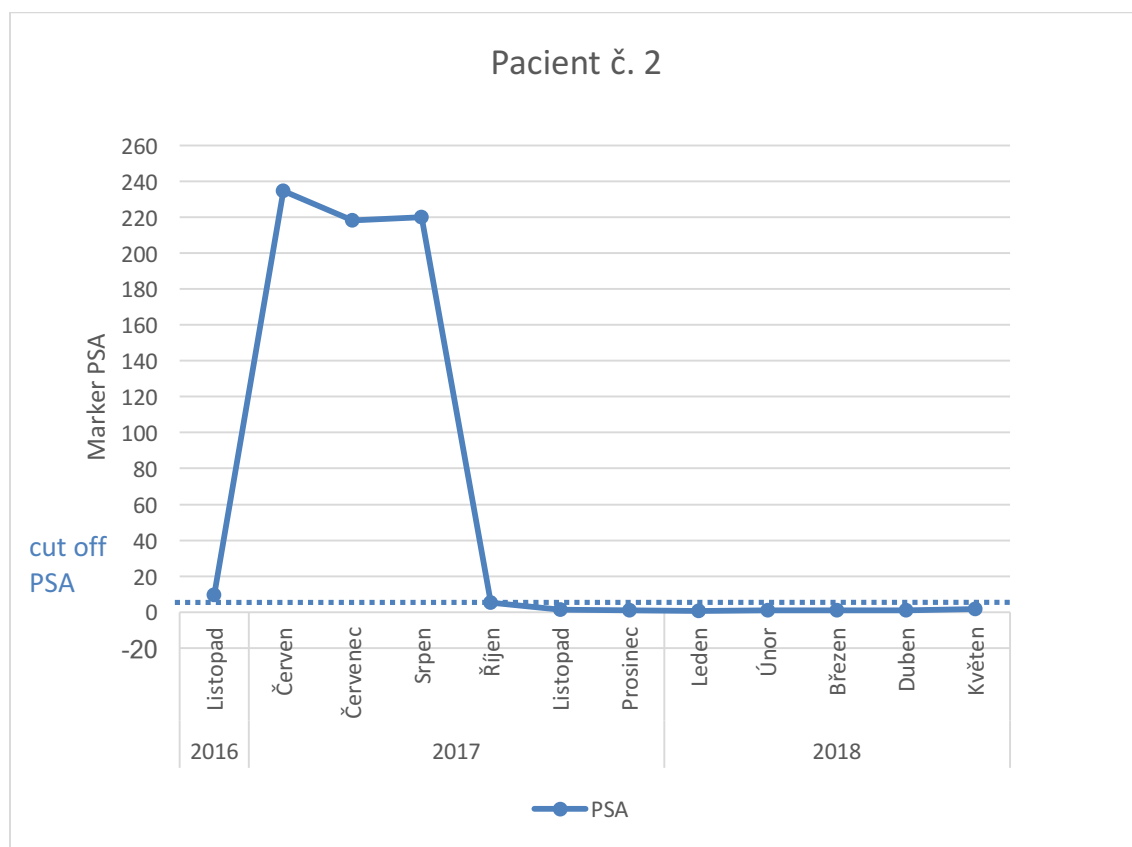
horní mez PSA 4,4 µg/l

Tabulka č. 5 Vyšetření pacienta č. 2

ROK	MĚSÍC	MARKER	LÉČBA-ZÁKROK
		PSA	
2016	Listopad	9,6	léčba Radium <sup>226</sup>
2017	Červen	234,7	
	Červenec	218,3	
	Srpen	220,1	
	Říjen	5,3	léčba X-tandi
	Listopad	1,3	
	Prosinec	0,9	
2018	Leden	0,7	
	Únor	0,8	
	Březen	0,8	
	Duben	1,1	
	Květen	1,5	

Zdroj: Oddělení klinické biochemie Nemocnice Pelhřimov, p. o.

Graf 4 Vyšetření pacienta č. 2



Zdroj: Vlastní zpracování

Marker PSA posloužil jako vhodný ukazatel průběhu nemoci. Počáteční léčba bez odpovědi, ovšem po zavedení léčby X-tandi se hodnoty markeru vrátily do normálu. Po celém období marker vhodně zobrazoval průběh nemoci.

### PACIENT č. 3

Rok narození 1998, Muž, Dg. C44.7.

- pacient sledován pro maligní melanom
- melanom objeven v dubnu roku 2016, následující měsíc byl odstraněn
- v červnu 2016 pacient na základě vyšetření bez recidivy, při dalším kontrolním odběru jsou markery v normě

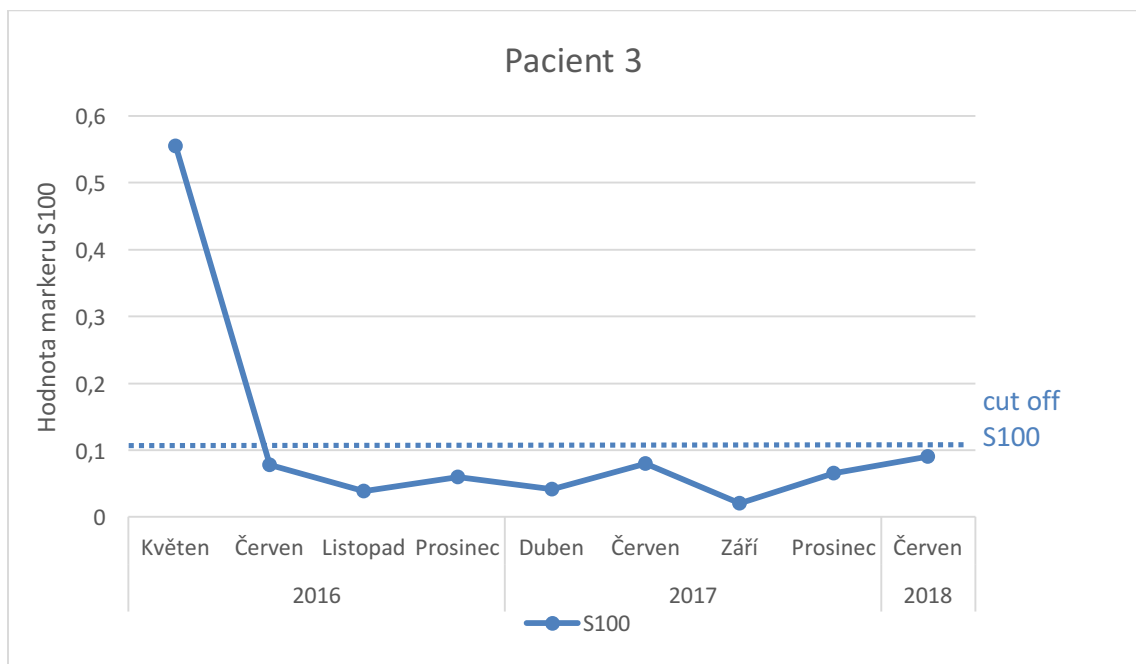
Referenční rozmezí – do 0,105µg/l

Tabulka č. 6 Vyšetření pacienta č. 3

ROK	MĚSÍC	MARKER	LÉČBA/ZÁKROK
		S100	
2016	Květen	0,555	Melanom odstraněn
	Červen	0,078	
	Listopad	0,039	
	Prosinec	0,06	
2017	Duben	0,042	
	Červen	0,08	
	Září	0,21	
	Prosinec	0,066	
2018	Červen	0,09	

Zdroj: Oddělení klinické biochemie Nemocnice Pelhřimov, p. o.

Graf 5 Vyšetření pacienta č. 3



Zdroj: Vlastní zpracování

Marker S100 při objevení melanomu správně zobrazoval zvýšené hodnoty. Po odstranění dochází ke stabilizaci hodnot u markeru a zároveň pacient byl v pořádku.



## PACIENT č. 4

Rok narození 1963, Žena, Dg. C20

- v prosinci 2015 pacientce zjištěn karcinom konečníku
- dále bylo provedeno ozáření a chemoterapie
- léčba ukončena v září roku 2016
- v březnu 2017 se markery opět zvyšují, pacientka opět vyšetřena, nález metastáz do jater
- provedeno odstranění metastáz na játrech
- dochází k poklesu hodnot markerů
- v srpnu 2017 se začínají opět zvyšovat hodnoty, pacientce se provádí další vyšetření, dochází k progresi onemocnění
- pacientka je znovu léčena chemoterapií
- od ledna roku 2018 – zahájena biologická léčba, dochází k poklesu hladin markerů, léčba pacientky probíhá nadále

CEA – referenční rozmezí do 4,7 µg/l, u kuřáků až do 10µg/l

CA19-9 – referenční rozmezí do 27kU/l

CA125 – referenční rozmezí do 25 kU/l

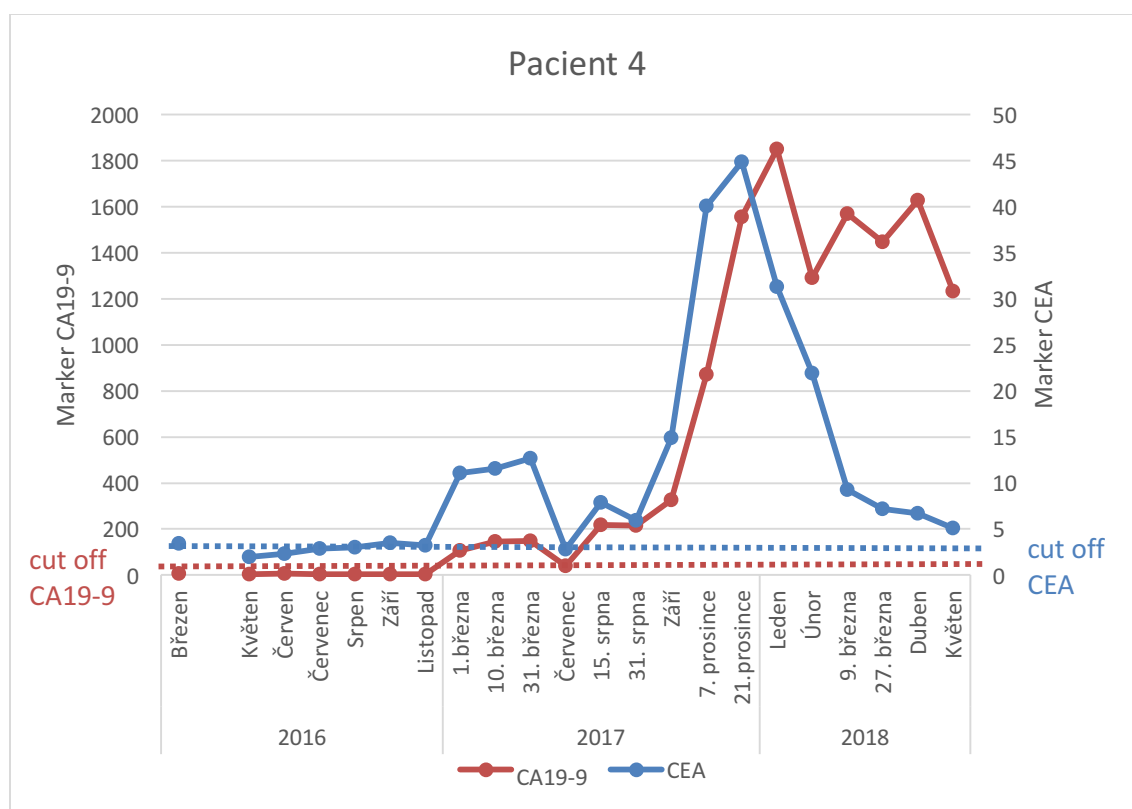
Tabulka č. 7 Vyšetření pacienta č. 4

ROK	MĚSÍC	MARKER			ZÁKROK/ LÉČBA
		CEA	CA19-9	CA125	
2016	Březen	3,4	7,11		Ozáření/ Chemoterapie
	Květen	2	4,85		
	Červen	2,3	5,62		
	Červenec	2,9	3,98		
	1. srpna	3	3,52		
	22. srpna	3,2	4,05		
	Září	3,5	4,49		Ukončena léčba
	Listopad	3,2	4,05		
2017	1.března	11,1	106,3		

	10. března	11,6	145,9		Odstranění metastáz
	31. března	12,7	148,6		
	Červenec	2,8	40,76		
	15. srpna	7,9	216,8		Progrese onemocnění
	31. srpna	5,9	216,1		
	Září	14,9	326,1		
	7. prosince	40,1	870,2	99,83	
	21. prosince	44,9	1555		
<b>2018</b>	Leden	31,3	1849	29,88	Biologická léčba
	Únor	21,9	1292	29,57	
	9. března	9,3	1569	71,97	
	27. března	7,2	1447	77,83	
	Duben	6,7	1627	66,78	
	Květen	5,1	1232	139,3	

Zdroj: Oddělení klinické biochemie Nemocnice Pelhřimov, p. o.

Graf 6 Vyšetření pacienta č. 4



Zdroj: Vlastní zpracování

Marker CEA i CA19-9 v letech 2016 a 2017 odpovídají vývoji onemocnění.

V roce 2018 marker CEA na rozdíl od CA19-9 odpovídá na biologickou léčbu.

Marker CA125 byl sledován při progresi onemocnění, ukazoval vysoké hodnoty a po nasazení biologické léčby rovněž neodpovídá.

## PACIENT č. 5

Rok narození 1933, Žena, Dg. C50.9

- od prosince 2007 pacientka léčena pro nádor prsu
- pacientce bylo provedeno ozáření a amputace prsu, dále probíhala hormonální léčba
- v listopadu 2015 dochází k výrazné recidivě onemocnění
- zahájena terapie Tamoxifenem
- markery progredují
- od března 2018 – léčba změněna na Letrozole (inhibitor aromatáz), léčba stále probíhá

CEA – referenční rozmezí do 4,7 µg/l, u kuřáků až do 10µg/l

CA15-3 – referenční rozmezí do 25 kU/l

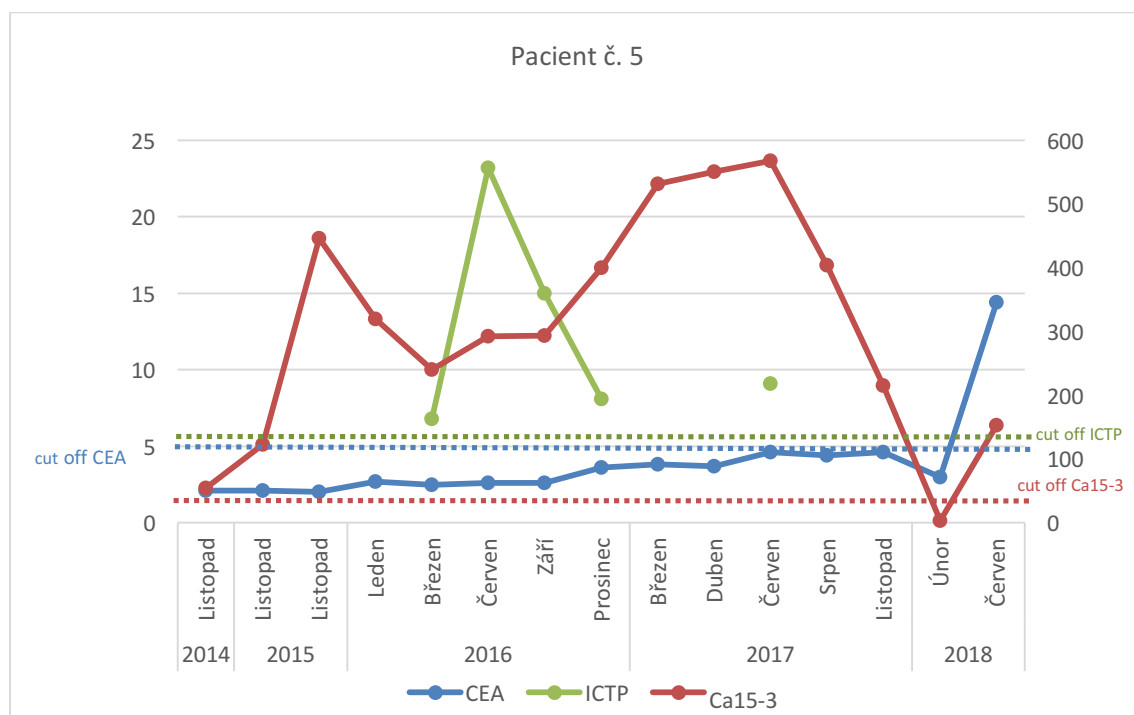
ICTP – horní mez u žen 5,6 µg/l

Tabulka č. 8 Vyšetření pacienta č. 5

ROK	MĚSÍC	MARKER			ZÁKROK/ LÉČBA
		CEA	Ca15-3	ICTP	
2014	Listopad	2,1	54,7		
2015	Listopad	2,1	122,8		
	Listopad	2	446		Tamoxifen
2016	Leden	2,7	320		
	Březen	2,5	240	6,8	
	Červen	2,6	292,1	23,2	
	Září	2,6	293,7	15	
	Prosinec	3,6	399,5	8,1	
2017	Březen	3,8	531,7		
	Duben	3,7	550,8		
	Červen	4,6	567,2	9,1	
	Srpen	4,4	404,32		
	Listopad	4,6	215,4		
2018	Únor	3	3,3		Letrozole
	Červen	14,4	152,7		

Zdroj: Oddělení klinické biochemie Nemocnice Pelhřimov, p. o.

Graf 7 Vyšetření pacienta č. 5



Zdroj: Vlastní zpracování

Marker CEA – v normě, i přes výstřel recidivy onemocnění.

Marker Ca15-3 vhodně zachycuje reakci na léčbu onemocnění.

Marker ICTP – nalezeny kostní léze, z toho důvodu je trvale zvýšena.

## PACIENT č. 6

Rok narození 1953, Muž, Dg. C34.1 horní lalok průduška, plíce

- od roku 2017 sledovány hladiny nádorových markerů
- v červnu roku 2017 u pacienta provedena chemoterapie a radioterapie
- dochází k snižování hladin markerů
- v lednu 2018 nastává recidiva onemocnění – pacientovi nasazena léčba pomocí chemoterapie, léčba probíhá nadále

referenční hodnoty CYFRA-21- do 3,3 μg/l

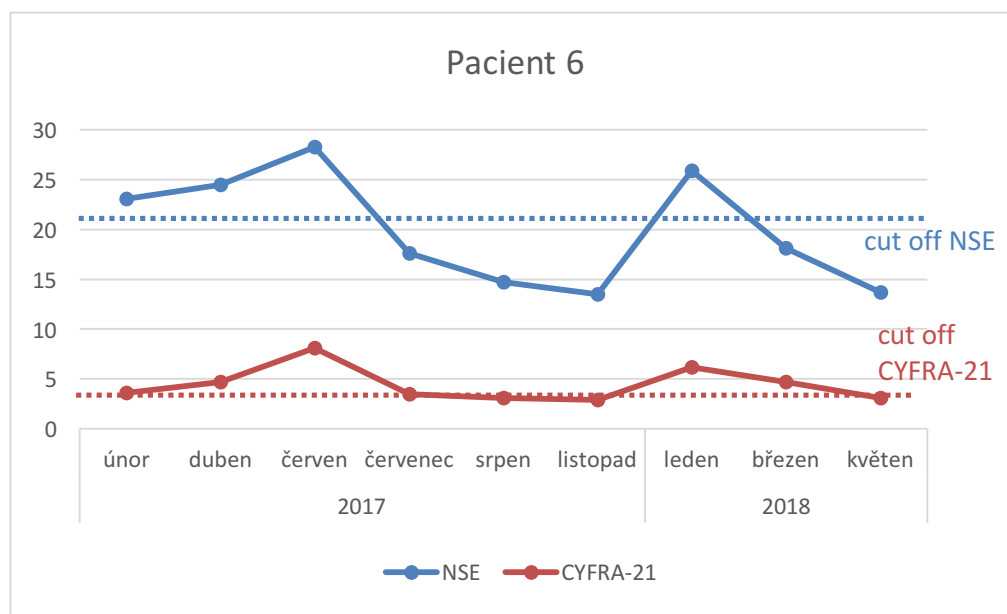
referenční hodnoty NSE-do 16,3 μg/l

Tabulka č. 9 Vyšetření pacienta č. 6

ROK	MĚSÍC	MARKER		ZÁKROK/LÉČBA
		NSE	CYFRA-21	
2017	únor	23,1	3,6	
	duben	24,5	4,7	
	červen	28,3	8,1	Zahájena chemoterapie
	červenec	17,6	3,5	
	srpen	14,7	3,1	
	listopad	13,5	2,9	
2018	leden	25,9	6,2	Nasazena chemoterapie
	březen	18,1	4,7	
	květen	13,7	3,1	

Zdroj: Oddělení klinické biochemie Nemocnice Pelhřimov, p. o.

Graf 8 Vyšetření pacienta č. 6



Zdroj: Vlastní zpracování

Marker NSE i CYFRA-21 vzájemně korelují a vhodně zobrazují stav onemocnění a jeho léčbu i po recidivě onemocnění, po nasazení chemoterapie v lednu 2018 se snižují.

## **Zhodnocení výsledků pacientů**

Podíváme-li se na proběhlá měření jednotlivých markerů, můžeme zhodnotit úspěšnost odhalení onemocnění.

Marker CEA byl u pacientů č. 1, č. 4 a č. 5. U pacientů č. 1 a č. 4 zobrazení přibližně odpovídalo vývoji nemoci, ovšem u pacienta č. 5 vykazovalo hodnoty v normě, přestože karcinom prsu byl vážný a musel být odhalen markerem jiným.

Marker CA19-9 byl u pacientů č. 1 a č. 4. V obou případech marker koreloval s vývojem onemocnění, tudíž byl pokaždé vhodným ukazatelem.

Marker PSA byl pouze u pacienta č. 2 a zde posloužil jako vhodný ukazatel.

Marker s100 byl u pacienta č. 3, kde ukazoval zvýšené hodnoty, před odstraněním metastáz, následně byly hodnoty v normě.

Marker CA125 byl vyšetřován při zhoršeném stavu pacienta č. 4 a v této fázi rovněž ukazoval správně vysoké hodnoty.

Marker CA15-3 byl pouze u pacienta č. 5 a hodnoty se pohybovaly výrazně nad cutt-off hodnotou. Spolehlivost tohoto markeru u vyšetření karcinomu prsu je vysoká.

Marker ICTP byl vyšetřován již po výrazném výstřelu recidivy a zobrazoval správně zvýšené hodnoty.

Markery CYFRA-21 a NSE u pacienta č. 6 oba ukazovaly shodně zvýšené hodnoty, které odpovídaly stavu onemocnění.

## 6 Diskuze

V bakalářské práci jsem se věnovala problematice stanovování nádorových markerů a jejich významu pro klinickou praxi. Práce je zaměřena na charakteristiku a hodnocení tumor markerů, jejich vyšetřovací metody, které se používají na Oddělení klinické biochemie Nemocnice Pelhřimov, p. o.

Hodnocená data dokazují, že tumorové markery jsou velmi užitečné při léčbě pacientů s nádorovým onemocněním. Zároveň je na datech z OKB Nemocnice Pelhřimov, p. o. vidět rostoucí počet vyšetření jednotlivých markerů v posledních 3 letech, kdy se z roku 2015 do roku 2017 zvýšil jejich počet téměř dvojnásobně, což potvrzuje první hypotézu této bakalářské práce a vystihuje zvyšující důležitost použití nádorových markerů. Hodnoty správně zvolených nádorových markerů jsou schopny kvalitně zobrazit úspěšnost terapie nádoru a v případě progresu nebo recidivy onemocnění upozornit lékaře na vyskytující se problém.

Druhá byla vyvrácena, protože v některých případech jsme u pacientů také našli, že marker neukazoval kritické hodnoty, přestože měl, protože nebyl správně zvolen. To je důvod k tomu, proč se neustále hledají nové nádorové markery, které by co nejlépe vyhovovaly potřebám praxe a splňovaly následující podmínky: (Nekulová et al., 1997)

- Měly by být co nejdříve zjištělné, pokud možno v počátečním stádiu vzniku zhoubného nádoru (metody s vysokou citlivostí).
- Typické pro určité orgány (orgánově specifické).
- Jejich koncentrace ve vzorcích by byla přímo úměrná velikosti nádoru, to by umožňovalo stanovení účinnosti léčby i odhad jejího dalšího vývoje.

Z vyšetřovaných markerů měl největší podíl CEA a PSA marker. Tyto markery potvrzují důležitost při diagnostice onkologicky nemocných pacientů vyšetřovaných v Nemocnici Pelhřimov, p. o.

## 7 Závěr

Nádorová onemocnění jsou spolu s nemocemi kardiovaskulárního systému nejběžnějšími nemocemi a nejčastější příčinou úmrtnosti. Stanovení hladiny nádorových markerů je nedílnou součástí vyšetřovacích metod pro včasné zachycení nemoci, stanovení diagnózy a kontroly průběhu léčby. Zatím není znám marker, jehož specifita a senzitivita by byla natolik vysoká, aby mohl být použit univerzální marker. Je známo mnoho specifických markerů, jejichž souběžné stanovení je dostatečně senzitivní pro záchyt velkého procenta onkologických onemocnění. Efektivní využití celé řady nádorových markerů v klinické praxi vyžaduje spolupráci praktických lékařů, onkologů, chirurgů a dalších specialistů.

Tumorové markery nám pomáhají k zachraňování lidských životů, ovšem nejlepší ochranou před nádorovými onemocněními stále zůstávají prevence a včasné zjištění nemoci. Proto je na každém z nás, s jakou důležitostí a odpovědností přistoupí k vlastnímu zdraví.



## Použité zdroje

1. ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK, 2011. *Obecná onkologie*. B.m.: Galén. ISBN 978-80-7262-715-8.
2. ATWOOD, Terasa, Peter CAMPBELL, Howard PARISH, Anthony SMITH, Frank VELLA a John STIRLING, 2006. *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*. B.m.: Ed. Richard Cammack. Oxford: Oxford University Press. 2. vydání. ISBN 0-19-852917-1.
3. BARTOŠ, Vladimír, Kristian ŠAFARČÍK, Maria KARLÍKOVÁ, Alexandra LOCHMANOVÁ, David ZEMAN, Zdeněk ŠVAGERA a Jindra VRZALOVÁ, 2013. *Imunoanalytické metody*. B.m.: Ostravská univerzita v Ostravě, Lékařská fakulka. ISBN 978-80-7464-366-8.
4. BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, Ondřej HRUŠÁK, Milan PAULÍK, Karel SMETANA, Anna ŠEDIVÁ, Radek ŠPÍŠEK, Luděk ŠPRONGL a Eva VERNEROVÁ, 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Praha: Grada Publishing, a. s. 2. vydání. ISBN 978-80-247-3533-7.
5. CIBULA, David, Luboš PETRUŽELKA a A KOL, 2009. *Onkogynekologie*. Český Těšín: Grada Publishing, a. s. ISBN 976-80-247-2665-6.
6. ČERMÁKOVÁ, Marta, Jarmila BLATTNÁ, Petr HORÁK a Marie HOSTLOVSKÁ, 2005. *Klinická biochemie 2. díl*. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů. ISBN 80-7013-424-0.
7. DASTYCH, Milan, Miroslava BEŇOVSKÁ, Petr BREINEK, Dana BUČKOVÁ, Zdenka ČERMÁKOVÁ, Vladimír SOŠKA, Jana TŮMOVÁ, Jana VÁVROVÁ, Miroslav VERNER a Hana VINOHRADSKÁ, 2011. *Klinická Biochemie*. B.m.: Masarykova Univerzita. ISBN 978-80-87192-18-4.
8. DUFFY, M., 1999. *CA 15-3 and related mucins as circulating markers in breast cancer*. [online]. 1999. B.m.: Clinical Biochemistry. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10505206>
9. EXKSCHLAGER, Tomáš a Richard PRŮŠA, 2002. *Laboratorní vyšetření v onkologii*. B.m.: TRITON. 1. vydání. ISBN 80-7254-186-2.

10. HOPLEY, Lara a Jo van SCHALKWYK, 2001. *The magnificent ROC* [online]. 2001. B.m.: Anaesthetis. [vid. 2018-05-11]. Dostupné z: <http://www.anaesthetist.com/mnm/stats/roc/Findex.htm>
11. KARLÍKOVÁ, Marie a Ondřej TOPOLČAN, 2013. *Principy imunoanalytických metod pro mediky* [online]. 2013. B.m.: Polypress. Dostupné z: <https://docplayer.cz/26116079-Principy-imunoanalytickych-metod-pro-mediky.html>
12. KAUŠITZ, Juraj a ET AT, 2014. *Nádorové Markery*. B.m.: Solen. ISBN 978-80-971340-1-3.
13. KRÁLOVÁ, Blanka, Ladislav FUKAL, Pavel RAUCH a Tomáš RUMML, 2001. *Bioanalytické metody*. třetí. B.m.: Vysoká škola chemicko.technologická v Praze. ISBN 80-7080-449-1.
14. KUŠNIEROVÁ, Pavlína, Zdeněk ŠVAGERA, Radka ŠIGUTOVÁ, Kristian ŠAFARČÍK, Vladimír BARTOŠ, David ZEMAN a Věra PLOTICOVÁ, 2014. *Klinická biochemie pro bakalářské studijní obory-1.díl* [online]. B.m.: Ostravská univerzita v Ostravě [vid. 2018-05-06]. ISBN 978-80-7464-519-8. Dostupné z: [https://portal.osu.cz/wps/PA\\_Uloziste\\_Dokumentu/servlet/DownloadDocument?itemID=A1001001A15B27B64854B10085](https://portal.osu.cz/wps/PA_Uloziste_Dokumentu/servlet/DownloadDocument?itemID=A1001001A15B27B64854B10085)
15. LOCHMANOVÁ, Alexandra, 2006. *Základy imunologie*. Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě, Zdravotně sociální fakulta. ISBN 80-7368-153-6.
16. LOTHAR, Thomas, 1998. *Clinical Laboratory Diagnostics: Use and Assessment of Clinical Laboratory Results*. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft. ISBN 3-9805215-4-0.
17. MAČÁK, Jiří, Jana MAČÁKOVÁ a Jana DVOŘÁČKOVÁ, 2012. *Patologie*. 2. vydání. B.m.: Grada. ISBN 978-80-247-3530-6.
18. NÁDOROVÉ MARKERY A JEJICH STANOVENÍ, 1998. 1998. B.m.: Karlova univerzita. [vid. 2018-05-20]. Dostupné z: <http://oldweb.lfp.cuni.cz/journals/imj/1998/1/>
19. NEKULOVÁ, M., M. ŠIMÍČKOVÁ a D. VALÍK, 2006. *Nádorové markery a*

- epigenetické faktory* [online]. 2006. B.m.: Masarykův onkologický ústav, Brno. Dostupné z: <http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0603-152.pdf>
20. NEKULOVÁ, Miroslava, Marta ŠIMÍČKOVÁ a M. ČERNOCH, 1997. *Nádorové markery*. 1997. B.m.: brožura vydaná firmou Boehringer mannheim Czech Brno.
21. NĚMCOVÁ, Irena, Petr RYCHLOVSKÝ a Ludmila ČERMÁKOVÁ, 2004. *Spektrometrické analytické metody*. 2. vydání. Praha: Univerzita Karlova v Praze. ISBN 80-246-0776-X.
22. RACEK, Jaroslav, Jaromír EISELT, Bedřich FRIEDECKÝ, Václav HOLEČEK, Miroslava NEKULOVÁ, Hana PITTROVÁ, Zdeněk RUŠAVÝ, Václav SENFT, Marie ŠAVLOVÁ, Pavel TĚŠÍNSKÝ a Miroslav VERNER, 2006. *Klinická biochemie*. 2. přepracované vydání. B.m.: Galén. ISBN 80-7262-324-9.
23. ROCHE DIAGNOSTICS, 2016. Roche Diagnostics. <http://www.roche-diagnostics.cz> [online] [vid. 2018-07-02]. Dostupné z: [http://www.roche-diagnostics.cz/home/produkty/cobas\\_6000.html](http://www.roche-diagnostics.cz/home/produkty/cobas_6000.html)
24. SCHNEIDERKA, Petr, Milan JIRSA, Antonín KAZDA, Petr KOCNA, Zdeněk MAŠEK, Miroslava NEKULOVÁ, Pavel PICK, Ivan ŠEBESTA, Marta ŠIMÍČKOVÁ a Petr ŠTERN, 2000. *Kapitoly z klinické biochemie*. Praha: Univerzita Karlova v Praze. ISBN 80-246-0140-0.
25. SLAVĚTÍNSKÁ, Martina, 2017. Laboratorní příručka OKB Nemocnice Pelhřimov, p.o. *Nemocnice Pelhřimov, p.o.* [online] [vid. 2018-03-02]. Dostupné z: [http://www.hospital-pe.cz/okb\\_prirucka/\\_start.htm](http://www.hospital-pe.cz/okb_prirucka/_start.htm)
26. STEPHEN, K. B. a W. J. MARSHALL, 2008. *Clinical biochemistry: metabolic and clinical aspects*. Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier. ISBN 0-443-10186-8.
27. SVOBODOVÁ, Šárka, Martin PEŠTA, Ondřej TOPOLČAN a Judita KINKOROVÁ, 2012. *Biomarkery v onkologii* [online]. 2012. Dostupné z: <https://docplayer.cz/24807253-biomarkery-v-onkologii.html>
28. SVOBODOVÁ, Šárka, 2001. Využití nádorových markerů pro diagnostiku, monitorování a stanovení prognózy u nádorů pankreatu. 2001.
29. ŠIMÍČKOVÁ, M. a M. NEKULOVÁ, 2004. *Nádorové Markery*. 2004. B.m.: Roche

diagnostic.

30. ŠVANGERA, Zdeněk a Radka ŠIGUTOVÁ, 2014. *E-klinická biochemie* [online]. 2014. Dostupné z: <https://elius.lfp.cuni.cz/ebio/KlinickaBiochemieCZ.pdf>
31. UNIQ, 2013. *ICTP RIA*. 2013. B.m.: UniQ, návod k použití.
32. VALÍK, D., 2014. *Doporučení k využití nádorových markerů v klinické praxi* [online]. 2014. [vid. 2017-12-03]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2014/2014-1/KBM-2014-1-Dopor-TM-22.pdf>

## Seznam obrázků:

Obrázek 1 Diagnostická specifita.....	14
Obrázek 2 ROC křivka.....	15
Obrázek 3 Schéma hlavních komponent imunoanalýzy.....	31
Obrázek 4 Schéma protilátky s navázaným antigenem .....	32
Obrázek 5 Příprava monoklonálních protilátek .....	33
Obrázek 6 Princip kompetitivní imunoanalýzy .....	35
Obrázek 7 Nekompetitivní „two site“ neboli „sandwichová“ imunoanalýza.....	36
Obrázek 8 Cobas e601 .....	44

## Seznam tabulek:

Tabulka 1 Frekvence vyšetřování nádorových markerů.....	40
Tabulka 2 Počet vyšetření markerů v Nemocnici Pelhřimov, p. o. ....	48
Tabulka 3 Referenční hodnoty tumorových markerů OKB Nemocnice Pelhřimov, p. o. .....	50
Tabulka 4 Vyšetření pacienta č. 1.....	51
Tabulka 5 Vyšetření pacienta č. 2.....	53
Tabulka 6 Vyšetření pacienta č. 3.....	55
Tabulka 7 Vyšetření pacienta č. 4.....	57, 58
Tabulka 8 Vyšetření pacienta č. 5.....	59
Tabulka 9 Vyšetření pacienta č. 6 .....	61

## **Seznam grafů:**

Graf 1 Průměrný počet vyšetření u 6 nejčastěji vyšetřovaných markerů .....	49
Graf 2 Vývoj jednotlivých markerů ve 3 letech.....	49
Graf 3 Vyšetření pacienta č. 1.....	52
Graf 4 Vyšetření pacienta č. 2.....	54
Graf 5 Vyšetření pacienta č. 3.....	56
Graf 6 Vyšetření pacienta č. 4.....	58
Graf 7 Vyšetření pacienta č. 5.....	60
Graf 8 Vyšetření pacienta č. 6.....	61

### **Seznam zkratek:**

OKB – Oddělení klinické biochemie

RTO – Radioterapeutické oddělení

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

TPA – Tkáňový polypeptidový antigen

TPS – Tkáňový polypeptidový specifický antigen

SCLC – Malobuněčný karcinom plic

Tzv. – Takzvaně

Susp. – Suspektní

WHO – World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

NM – Nádorový marker

MZČR – Ministerstvo zdravotnictví České republiky

LIS – laboratorní informační systém

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová