

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2012

Tereza Toiflová

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

**Biomarkery ovariálního karcinomu a metody jejich
stanovení**

Tereza Toiflová

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
2012

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL-TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

**Biomarkers of ovarian carcinoma and methods of their
analysis**

Tereza Toiflová

BACHELOR THESIS

2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Tereza Toiflová**
Osobní číslo: **C09572**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Biomarkery ovariálního karcinomu a metody jejich stanovení**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Vypracujte teoretickou rešerši zabývající se biomarkery ovariálního karcinomu se zaměřením převážně na proteiny CA125 a HE4. Uveďte možnosti stanovení těchto biomarkerů se současným porovnáním citlivosti s ohledem na predikci vzniku onemocnění.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **3. října 2011**

Termín odevzdání bakalářské práce: **22. června 2012**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2012

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 22. 06. 2012

Tereza Toiflová

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, pomoc při řešení problémů a připomínky v průběhu vypracování bakalářské práce.

ANOTACE

Tato práce se zabývá biomarkery ovariálního karcinomu. V první části se zaměřuje na prognózu onemocnění, příznaky a diagnostiku. Práce popisuje jednotlivé způsoby diagnostiky, jako je gynekologické vyšetření, histologické vyšetření, CT vyšetření a laboratorní vyšetření, které je nejdůležitější. K laboratornímu vyšetření se nejčastěji používají tzv. nádorové markery, což jsou látky, které nám poskytují informace o vlastnostech a chování nádoru. V poslední části práce jsou rozebrány jednotlivé markery a metody jejich stanovení, které by mohly být použity pro diagnostiku karcinomu ovaria, zejména se zaměřením na nově objevený marker HE4.

Klíčová slova: karcinom ovaria; nádorové markery; CA125; HE4

ANNOTATION

This work deals with biomarkers of ovarian cancer. The first part is focused on the prognosis of the disease, symptoms and diagnosis. This work describes the various methods of diagnosis such as gynecological examinations, histological examinations, CT scans and laboratory analysis of tumor markers that are the most important. Tumor markers are substances that provide us with information about the properties and behaviour of the tumor. The last part is focused on description of characteristics of individual tumor markers focusing particularly on the newly discovered marker HE4, and analytical methods for their analysis are described.

Keywords: ovarian cancer; tumor marker; CA125; HE4

Seznam zkratek

AFP	Alpha-fetoprotein – Alfa-fetoprotein
BRCA-1, BRCA-2	Breast cancer antigen – Antigen karcinomu prsu
CA125	Cancer antigen 125 – Antigen karcinomu 125
CA 19-9	Cancer antigen 19-9 – Antigen karcinomu 19-9
CA 50	Cancer antigen 50 – Antigen karcinomu 50
CA 72-4	Cancer antigen 72-4 – Antigen karcinomu 72-4
CEA	Carcinomembryonic antigen – Karcinoembryonální antigen
CT	Computed Tomography – Počítačová tomografie
CV	Cyclic voltammetry – Cyklická voltametrie
CYFRA 21-1	Fragment of cytokeratin – Fragment cytokeratinu 19
ECLIA	Electrochemiluminescence – Elektrochemiluminiscence
EIA	Enzyme Immuno Assay – Enzymová imunoanalýza
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay – Destičková enzymová imunoanalýza
GE	Gold electrode – Zlatá elektroda
GICA	Gastrointestinal cancer antigen – Antigen gastrointestinálního karcinomu
hCG	Human chorionic gonadotropin – Lidský choriový gonadotropin
HE4	Human Epididymis Protein-4
HRP	Horseradish peroxidase – Křenová peroxidáza
ITO	Tin-doped indium oxide – Elektroda z oxidu titaničitého dopovaného indiem
LASA	Lipid associated sialic acid – Na lipidy vázaná kyselina sialová
LD	Lactate dehydrogenase – Laktátdehydrogenáza
MMP-2	Matrix metalloproteinases 2 – Matrix metaloproteináza 2
MMP-7	Matrix metalloproteinases 7 – Matrix metaloproteináza 7
MMP-9	Matrix metalloproteinases 9 – Matrix metaloproteináza 9
MR	Magnetic resonance paging – Magnetická rezonance
MUC1	Mucin 1
MUC16	Mucin 16

NPV	Negative predictive value – Negativní prediktivní hodnoty
NSE	Neuron specific enolase – Neuron specifická enoláza
PAP	Prostatic acid phosphatase – Kyselá fosfatáza
PCR	Polymerase chain reaction – Polymerázová řetězová reakce
PET/CT	Positron emission tomography/computed tomography – Pozitronová emisní tomografie/počítačová tomografie
PI	Predictive index – Prediktivní index
PLAP	Placental alkaline phosphatase – Placentární alkalická fosfatáza
PMMA	Polymethylmethacrylate – Polymethylmetakrylát
PP	Predictive probability – Prediktivní pravděpodobnost
PPV	Positive predictive value – Pozitivní prediktivní hodnoty
PSA	Prostate specific antigen – Prostatický specifický antigen
RAF	Reactants acute phase – Reaktanty akutní fáze
ROMA	Risk of ovarian malignancy algorithm – Algoritmus pro odhad rizika zhoubného onemocnění vaječníků
RTG	Rentgenové vyšetření
SMRP	Soluble mesothelin-related peptides – Solubilní mezotelinu příbuzné peptidy
TiC	Titanium carbide – Titanium karbid
Tk	Thymidine kinase – Thymidinkináza
TMB	Tetramethylbenzidine – Tetramethylbenzidin
TPA	Tissue polypeptide antigen – Tkáňový polypeptidový antigen
TPS	Tissue polypeptide specific antigen – Tkáňový polypeptidový specifický antigen
USG	Ultrasonography – Ultrasonografie
WFDC	Whey acidic four-disulfide core
WFDC2	WAP type four disulfide core 2

Obsah

1	Úvod	13
2	Ovariální karcinom	14
2.1	Prognóza onemocnění	14
2.2	Klinické příznaky	14
2.3	Klasifikace nádorů	15
2.4	Rizikové skupiny.....	15
2.5	Diagnostika ovariálního karcinomu	16
3	Nádorové (Tumor) markery	17
3.1	Humorální nádorové markery	18
3.2	Buněčné nádorové markery.....	19
3.3	Vlastnosti nádorových markerů	19
3.4	Jednotlivé nádorové markery	20
3.4.1	CA125 (cancer antigen)	20
3.4.2	AFP (alfa1-fetoprotein).....	21
3.4.3	hCG (lidský choriový gonadotropin)	21
3.4.4	CYFRA 21-1 (fragment cytokeratinu 19).....	21
3.4.5	TPA (tkáňový polypeptidový antigen).....	22
3.4.6	CEA (karcinoembryonální antigen).....	22
3.4.7	CA 15-3 (cancer antigen).....	22
3.4.8	CA 19-9 (cancer antigen).....	22
3.4.9	CA 72-4 (cancer antigen).....	22
3.4.10	CA 50 (cancer antigen)	22
3.4.11	SMRP (soluble mesothelin-related peptides).....	23
3.4.12	HE4 (Human Epididymis Protein-4)	23
3.5	Kombinace nádorových markerů a jejich vliv na citlivost stanovení	24

4	Metody stanovení nádorových markerů	26
4.1	ELISA a EIA	27
4.2	Elektrochemiluminiscence a chemiluminiscence	31
4.3	Imunohistochemické metody	35
4.4	Imunofluorescenční metody	35
4.5	Studie s buněčnými liniemi	36
4.6	Využití genů	36
5	Odhad rizika vzniku karcinomu ovaria	37
6	Závěr	39
7	Seznam použité literatury	40

1 Úvod

Karcinom ovaria je velmi závažné onemocnění, které souvisí s vysokou úmrtností žen po celém světě. Karcinom ovaria je léčitelné onemocnění, pokud je však diagnostikováno včas. Většina typů karcinomu je však diagnostikována až v pokročilém stádiu, kde šance na přežití klesá. Špatná diagnostika je dána především tím, že karcinom dlouhodobě nevyvolává žádné klinické příznaky.

Nejdůležitějším pro stanovení diagnózy je laboratorní stanovení hladin tzv. nádorových markerů. Nádorové markery neboli Tumor Markers jsou látky, které nám poskytují informace o chování a vlastnostech nádoru. Nejčastěji se jedná o proteiny, glykoproteiny či glykolipidy. Mohou se využít v diagnostice, k vyhledávání maligních onemocněních, při stanovení prognózy a monitorování nemocného v průběhu léčby.

Pro diagnostiku karcinomu ovaria se nejčastěji používá marker CA125 a v poslední době také HE4. HE4 je také známý jako WAP-type four disulphide core 2 (WFDC2). HE4 vykazuje vysokou citlivost v časných stádiích onemocnění. Je tedy vhodný pro diagnostiku raných fází karcinomu ovaria. Právě na tyto dva markery se tato bakalářská práce zaměřuje nejvíce.

Cílem práce bylo popsat vlastnosti jednotlivých markerů a také jednotlivé metody stanovení těchto markerů jak samotných, tak kombinací několika z nich. Nejčastěji se používají metody imunochemické, konkrétně ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), EIA (Enzyme Immuno Assay), ECLIA (elektrochemiluminiscence), dále pak chemiluminiscence a také imunohistochemické a imunofluorescenční metody.

2 Ovariální karcinom

Karcinom ovaria je onemocnění postihující vaječnicku. Vaječník (latinsky ovarium) je párový orgán, který je uložen po obou stranách dělohy a nachází se u ženy v malé pánvi. Vejcovody je spojen s dělohou. Vaječnicku plní několik funkcí. Produkují pohlavní hormony, regulují menstruační cyklus, slouží jako zásobárna ženských pohlavních buněk. Karcinom ovaria je jednou z nejčastějších příčin úmrtí žen na celém světě. Nejčastěji se vyskytuje u žen mezi 50.–75. rokem. Výjimečně se však může vyskytovat i u žen mladších, ve věku kolem 30 let. Karcinomem ovaria každoročně onemocní 1200 žen a kolem 700 jich na toto onemocnění zemře [1–11].

2.1 Prognóza onemocnění

Pokud je karcinom ovaria diagnostikován včas, je prognóza většinou velmi příznivá. Až 90 % žen s touto diagnózou přežije [12]. Naneštěstí většina typů karcinomu ovaria je diagnostikována až v pokročilém stádiu, kde šance na přežití je i přes invazivní operace a chemoterapie menší než 20 % [5, 13]. Ovariální karcinom se ze všech nádorových onemocnění podílí na mortalitě z více než 45 %. Po karcinomu endometria jsou ovariální nádory na druhém místě nejčastějších gynekologických malignit a jejich výskyt stále stoupá. Česká republika je na 4. místě v Evropě s největším výskytem. Ovariální nádory představují přibližně 15–20 % ze všech gynekologických zhoubných nádorů. Prognóza se odvíjí od klinického stádia. 75–80 % nádorů je diagnostikováno v pokročilém stavu, tj. ve III. a IV. stádiu se špatnou prognózou. Lepší prognózu mají většinou mladší ženy (ve věku pod 50 let), v dobrém zdravotním stavu, po operaci s žádným nebo minimálním zbytkovým nádorem [10, 12].

2.2 Klinické příznaky

Pozdní diagnostika je dána zejména absencí časných klinických příznaků. Nádor dlouho nevyvolává žádné příznaky a i při gynekologických vyšetřeních nemusí být diagnostikován [14]. Mnoho nádorů je diagnostikováno, až když je nádor rozsetý po dutině břišní. Projevuje se pak bolestí břicha, jeho zvětšením, tlakovými obtížemi, hubnutím, pálením žáhy a celkovou únavou. Protože jsou vaječnicku velmi malý orgán, který je uložen mimo dělohu a ukryt pod střevními kličkami a nevytváří žádnou překážku, bývá karcinom ovaria objeven pozdě [11].

2.3 Klasifikace nádorů

Ve vaječníku se může vyskytovat až 10 typů nádorů, které mohou být jak zhoubné, tak nezhooubné. Pro vaječníky jsou také typické cystické nádory, které jsou vyplněné tekutinou či hlenem a mohou dosahovat velkých rozměrů. Některé nádory ovaria mají nízký maligní potenciál a jsou tedy ve své malignitě hraniční. Pokud se jedná o nádory nezhooubné, nazývají se **cystadenomy**, pokud se jedná o nádory zhoubné, schopné tvořit metastáze, nazývají se **cystadenokarcinomy** [11].

Maligní nádory ovaria zakládají druhotná ložiska, tzv. metastáze. Druhotná ložiska vytváří nejčastěji v děloze, na povrchu střev, jater, peritonea, ale také v plicích. Navíc metastáze produkují tekutinu, která se shromažďuje v dutině břišní [12].

Nejčastějším typem karcinomu ovaria je epitelový karcinom. Představuje až 90 % všech ovariálních karcinomů. Vzniká na povrchových neboli epitelových buňkách ovaria. Dále se dělí na karcinomy serózní (nejčastější), acinózní a adenokarcinomy [12]. Méně časté jsou karcinomy germinativní a stromální, které vychází ze zárodečných nebo jiných buněk ovaria a tvoří 10–20 % [15].

2.4 Rizikové skupiny

V obecném pojetí je v onkologii rizikovým faktorem vše, co zvyšuje riziko vývoje zhoubného nádoru daného jedince [16]. Dlouhá ovulační aktivita jako je pozdní menopauza a časná menarche zvyšuje riziko vzniku karcinomu. Hormonální antikoncepce, gravidita nebo laktace mohou riziko karcinomu ovaria naopak snižovat [10]. Podle Votrubové (2009) může dlouhodobé užívání hormonální antikoncepce snížit riziko až o 40 % [15]. Ženy, které nerodily, jsou obézní nebo příliš konzumují živočišné tuky, mohou mít naopak zvýšené riziko nádoru. Roli také hrají genetické faktory, asi 5 %, a to především ženy s mutací genu BRCA-1 a BRCA-2 (breast cancer antigen) [10]. Zvláště by měly být pozorovány ty ženy, které mají dědičné dispozice k ovariálnímu karcinomu, nebo ty, které mají prokázanou mutaci genu BRCA-1, BRCA-2. Tyto ženy by měly vyhledat specializovanou onkogenetickou konzultaci [11]. Gen BRCA-1 se nachází na dlouhém raménku 17. chromozomu, gen BRCA-2 se nachází na dlouhém raménku 13. chromozomu. Zárodečná mutace genů BRCA-1, BRCA-2 se přenáší autozomálně dominantně. Riziko vzniku nádoru se liší pro oba geny. U nositelek mutací genu BRCA-1 jsou nádory diagnostikovány v průměru ve věku o 7–10 let nižším, než u zdravých žen. U nositelek genu BRCA-2 se průměrný věk v době diagnózy neliší od pacientek se sporadickou formou karcinomu [16].

2.5 Diagnostika ovariálního karcinomu

Při diagnostice karcinomu ovaria se nejdříve doporučuje gynekologické vyšetření. Součástí gynekologických vyšetření je také odběr krve na nádorový marker CA125, jehož hladina bývá u nádoru ovaria zvýšena [11].

Kromě gynekologického vyšetření se také provádí USG břicha a malé pánve, transvaginální USG (ultrasonografie), případně RTG (rentgenové vyšetření) plic [10]. Z dalších zobrazovacích metod se používá MR (magnetická rezonance) a CT (počítačová tomografie). Dalším vyšetřením je PET/CT (Pozitronová emisní tomografie/počítačová tomografie), které je citlivější. Základním obrazem CT vyšetření nádoru ovaria je ložisko v malé pánvi. Při tomto vyšetření je však velmi obtížné přesně rozpoznat, zda se jedná o benigní nebo maligní nádor. Maligní nádor se projevuje průměrem větším než 4 cm, polycyklickým tvarem, silnou nepravidelnou stěnou, a přítomností silných, nápadných cév v okolí karcinomu [15, 17, 18].

Pokud dojde k nálezům karcinomu, doporučuje se histologické vyšetření [10]. Pro histologii se provádí odběr vzorku z tkáně neboli biopsie. Vzorek na histologické vyšetření lze získat i na základě cytologického vyšetření. Nádor produkuje tekutinu, která se hromadí v dutině břišní. Ta je z dutiny břišní odebrána, vyšetřena a podle charakteru buněk je určena diagnóza [19].

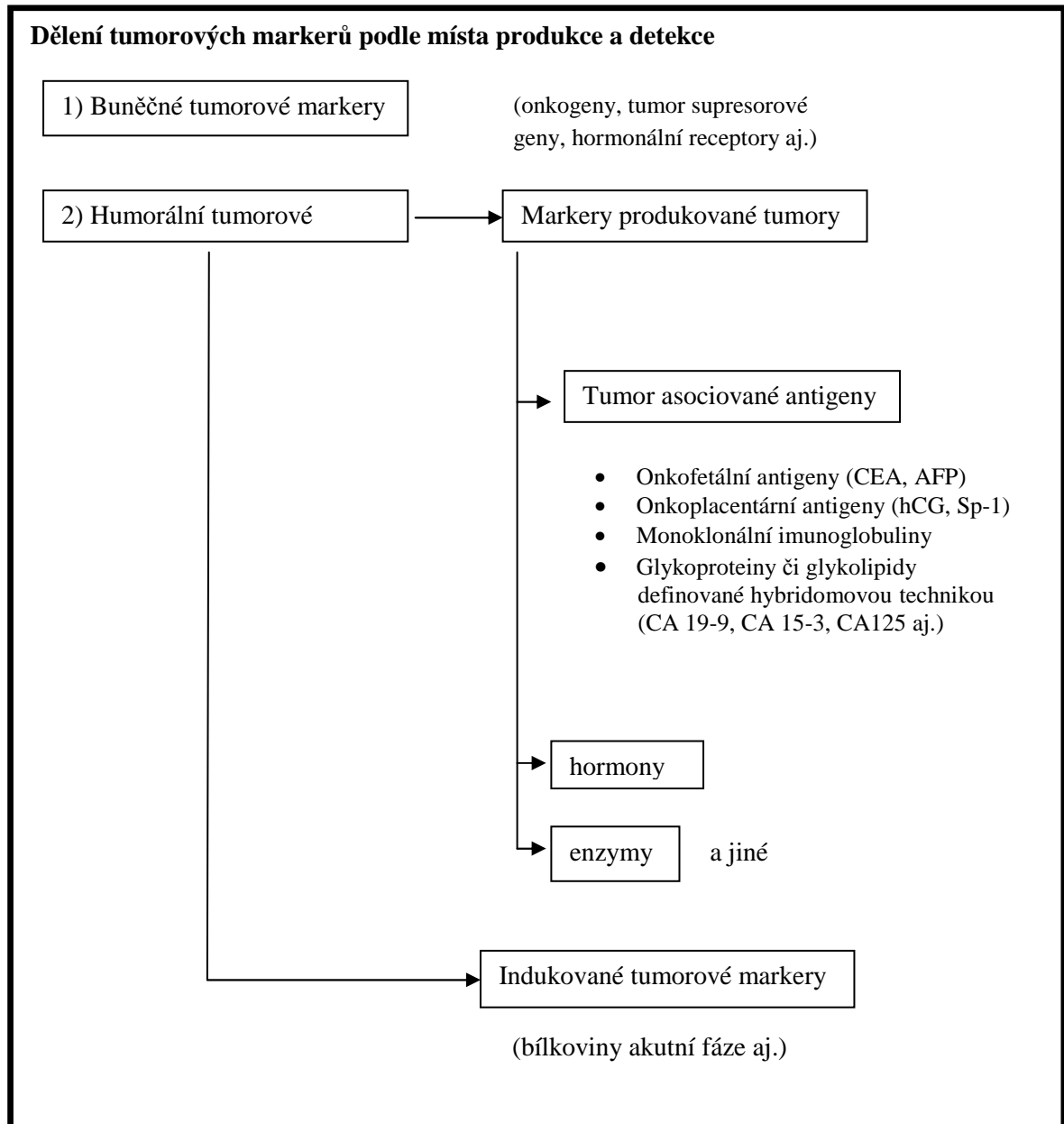
Nejdůležitějším vyšetřením je pak laboratorní stanovení hladin tzv. nádorových markerů. Nejčastěji používanými nádorovými markery u karcinomu ovaria jsou CA125, CA 72-4 (cancer antigen), CEA (karcinoembryonální antigen) a v poslední době také nově objevený marker, HE4 (Human Epididymis Protein) [1, 2, 13, 17, 20–22].

3 Nádorové (Tumor) markery

Jak již bylo zmíněno, jedním z nejdůležitějších nástrojů diagnostiky karcinomu ovaria hlavně v časných fázích onemocnění je stanovení hladin nádorových markerů. Nádorové markery neboli Tumor Markers jsou látky, které nám poskytují informace o chování a vlastnostech nádoru. Nádorovým markerem rozumíme substanci přítomnou v nádoru nebo produkovanou nádorem do tělních tekutin. Tumorové markery jsou produkovány buď přímo nádorovými buňkami, tj. s nádorem asociované antigeny, nebo jinými tkáněmi, tzv. indukované nádorové markery [23]. Nejčastěji se jedná o proteiny, glykoproteiny, glykolipidy. Využívají se v diagnostice, k vyhledávání maligních onemocněních, při stanovení prognózy a monitorování nemocného v průběhu léčby [24].

Testy na nádorové markery vyžadují vysokou citlivost, aby umožnily odhalení časných fází onemocnění. Tyto testy také musí být dostatečně specifické a tím chránit pacienty před falešně pozitivními výsledky. Nádorové markery mohou hrát klíčovou roli při odhalování nemocí a hodnocení reakce na terapii ve vybraných skupinách pacientů [25]. Nádorové markery lze měřit kvalitativně nebo kvantitativně metodami chemickými, imunologickými nebo metodami molekulární biologie [26]. Nádorové markery se dělí na humorální a buněčné a také je můžeme dělit podle místa produkce a detekce (tabulka 1) [23, 27].

Tabulka č. 1: Dělení tumorových markerů podle místa produkce a detekce (převzato z: [27])



3.1 Humorální nádorové markery

Humorální nádorové markery dělíme na onkofetální antigeny, tkáňové či orgánově specifické antigeny, nespecifické antigeny a tumor markery.

- *Onkofetální antigeny* – jsou molekuly, které organismus fyziologicky produkuje ve fetálním období vývoje a po narození je tvoří jen v souvislosti s nějakým onemocněním, zpravidla nádorovým. Mezi tyto látky patří např. α_1 -fetoprotein

(AFP), lidský choriový gonadotropin (hCG), karcinoembryonální antigen (CEA), placentární alkalická fosfatáza (PLAP).

- *Tkáňové či orgánově specifické antigeny* – jsou látky, které jsou fyziologicky přítomné ve zdravé tkáni či orgánu a mimo něj pronikají jen v minimálním množství. Teprve při onemocnění, nejčastěji nádorovém, dochází k jejich uvolnění. Mezi tyto látky patří prostatický specifický antigen (PSA), kyselá fosfatáza (PAP), neuron specifická enoláza (NSE), rozpustné fragmenty cytokeratinů (TPA, TPS, CYFRA 21-1), většina CA antigenů (cancer antigen).
- *Nespecifické antigeny a tumor markery* – jsou látky, které se fyziologicky nevyskytují ve zdravé tkáni či orgánu. Zpravidla souvisí s nádorovým onemocněním. Patří mezi ně ferritin, laktátdehydrogenáza (LD), thymidinkináza (Tk), β_2 -mikroglobulin, některé reaktanty akutní fáze (RAF), na lipidy vázaná kyselina sialová (LASA) [21, 22].

3.2 Buněčné nádorové markery

Stanovení celulórního nádorového markeru má význam pro optimalizaci léčebné strategie, a to v cytosolu tkáně. Běžně se využívá stanovení estradiolu u karcinomu prsu. Mohou být využívány i jiné látky, jejichž význam a stanovení je dosud diskutovaným tématem. Je to např. onkoprotein HER-2/neu nebo protein p53 [23].

3.3 Vlastnosti nádorových markerů

Základní vlastností nádorových markerů je specifita vzhledem k malignímu onemocnění. Neexistuje univerzální nádorový marker, kde by specifita a senzitivita dosahovala ideálních 90–100 %. Proto nezvýšená koncentrace nádorového markeru nemůže být absolutním důkazem nepřítomnosti maligního onemocnění a naopak pozitivní výsledek vyšetření nemusí nutně znamenat přítomnost nádorového procesu [23]. Schopností prokázat přítomnost zhoubného nádoru v počátečním stádiu je dána citlivostí stanovení [24]. Citlivost a specifita spolu navzájem souvisí u každého testu. Jejich poměr závisí na tzv. cut-off value (diskriminační hodnota). Pokud je 95 % specifita testu, ale citlivost menší než 50 %, je test nepoužitelný. Zvýšené hladiny nádorových markerů mohou ukazovat na různou lokalizaci nádoru či jiná onemocnění. Například nádorový marker CEA je zvýšen při jaterních onemocněních, CA 15-3 při karcinomu prsu, Tk při virových onemocněních, CA125 při karcinomu ovaria [27].

3.4 Jednotlivé nádorové markery

U karcinomu ovaria se laboratorně stanovují hladiny různých markerů, a to jak samostatně, tak v kombinaci několika. Některé nádorové markery se používají jako hlavní, ale např. CA 72-4 se používá jako doplňkový (tabulka 2) [27]. Nejlepších výsledků dosahují kombinace CA125 s CA 72-4, CEA, TPA (tkáňový polypeptidový antigen). Dále se může použít marker CA 15-3, AFP (alfafetoprotein), hCG (lidský choriový gonadotropin), CA 19-9, CA 50, CYFRA 21-1 (fragment cytokeratinu 19) a v poslední době také nádorový marker označovaný jako HE4 [22].

Tabulka č. 2: Tumorové markery karcinomu ovaria (převzato z: [27])

LOKALIZACE A TYP NÁDORU		TUMOROVÝ MARKER		ÚČEL STANOVENÍ
		hlavní	doplňkový	
Karcinom ovaria	serózní	CA125		Kontrola průběhu onemocnění a léčby, určení stadia
	mucinózní	CA 19-9, CEA	CA 72-4	
	germinativní	AFP, hCG		

3.4.1 CA125 (cancer antigen)

V současné době se tento marker nejčastěji využívá k diagnostice karcinomu ovaria. CA125 je nejspolehlivější marker pro toto onemocnění. Je však spojen s vysokou falešnou pozitivitou žen s benigním gynekologickým onemocněním. I když celkově má CA125 vysokou citlivost, jeho klinické využití, jako časného markeru pro screening, je těžce limitováno, protože má nízkou citlivost u pacientek s počátečním stádiem karcinomu ovaria [13, 28]. Slouží pro diagnostiku a monitorování léčby karcinomu ovarii především serózního typu. CA125 je glykoprotein s vysokou molekulovou hmotností. Ve tkáních lze CA125 detekovat ve vejcovodu, endometriu, endocervixu atd. [4, 5, 22, 29].

Jeho biologický poločas jsou 4 dny. Vyšetřuje se ze séra, plazmy [30]. Zvýšené hladiny CA125 mohou být detekovány přibližně u 50 % pacientek s I. stádiem karcinomu ovaria, v případě pacientek s pokročilým stádiem onemocnění již u více než 90 %. Zvýšené hladiny CA125 se někdy vyskytují i u pacientek s benigním gynekologickým onemocněním, jako je pánevní zánětlivé onemocnění, ale i u pacientek s benigním onemocněním, které se netýká pohlavních orgánů, jako je hepatitida,

pankreatitida, renální selhání nebo u pacientek s nádorem, který se netýká pohlavních orgánů [2, 22, 31].

Zvýšené hladiny CA125 se také nacházejí v séru těhotných žen a v mateřském mléce, při menstruaci, zápalu plic, cirhóze, karcinomu endometria, prsu, slinivky a trávicího traktu. Zvýšená hladina CA125 je spojována (spíše překvapivě) i s příčinou srdečního selhání. CA125, také známý jako MUC16 (mucin), byl identifikován pomocí monoklonální protilátky OC 125 [29, 32, 33].

Referenční interval pro monitorování histologicky prokázaného nádoru ovaria je do 35 kU/l, především se ale doporučuje sledovat dynamiku změn jeho hladin v čase. Pro prvotní diagnostiku je horní hranicí normy 65 kU/l [3, 14, 34].

3.4.2 AFP (alfa1-fetoprotein)

AFP je glykoprotein, který se strukturně podobá albuminu. Patologicky se vyskytuje zejména u hepatocelulárního karcinomu. Jestliže nádor byl zcela chirurgicky odstraněn, měla by hladina AFP klesnout zpět k normálním hodnotám. Vysoké hladiny AFP jsou spojeny s neúplnou resekcí tumoru v případě operace. Opakovaná rostoucí hladina může značit recidivu onemocnění. Hladina AFP je také zvýšena u některých nádorů ze zárodečných buněk, jako právě u karcinomu ovaria a varlete [32, 35].

3.4.3 hCG (lidský choriový gonadotropin)

hCG, přesněji β -hCG patří do skupiny glykoproteinových hormonů s relativní molekulovou hmotností cca 40 kDa [31]. Zvýšené hodnoty hCG se nachází u karcinomu zárodečných buněk, jako je karcinom ovaria nebo varlat. Může být také zvýšen v těhotenství u tzv. choriokarcinomu. Slouží jednak k diagnostice a jednak k monitorování průběhu léčby [32].

3.4.4 CYFRA 21-1 (fragment cytokeratinu 19)

Cytokeratiny obecně tvoří multigenní rodinu 20-ti polypeptidů, které jsou součástí středního vlákna epitelové buňky. CYFRA 21-1 se využívá pro monitorování karcinomu plic, ale také může být zvýšen u karcinomu slinivky břišní, žaludku, jater, prsu, prostaty, krku a močového měchýře [32]. Také může být zvýšen u karcinomu ovaria. Existuje také v rozpustné formě, která může být uvolněna do oběhu proliferujících buněk nebo případně při aktivaci proteolytických enzymů během buněčné nekrózy [31, 36, 37].

3.4.5 TPA (tkáňový polypeptidový antigen)

TPA je směs rozpustných fragmentů cytokaretinů. Může být prokázán téměř ve všech buňkách epitelového původu. Převažuje u něj citlivost nad specifíčností. Je zvýšen u karcinomu prsu, močového měchýře, ovaria, děložního čípku [27].

3.4.6 CEA (karcinoembryonální antigen)

Karcinoembryonální antigen je glykoprotein o molekulové hmotnosti 180–200 kDa. Obsahuje sacharidy, které se skládají z manózy, galaktózy a k nim vázané kyseliny salicylové. Patří do rodiny imunoglobulinů. Zvýšené hladiny se nachází u karcinomu žaludku, rekta, jater, plic, prsu, ovaria. Může být také zvýšen u jinak zdravých kuřáků. Pokud je hladina markeru u daného onemocnění zvýšena, může být tento marker použit ke sledování průběhu léčby [36–39].

3.4.7 CA 15-3 (cancer antigen)

Jedná se o glykoprotein o relativní molekulové hmotnosti 300 kDa [21]. CA 15-3, známý jako MUC1 (mucin), je nejrozšířenější marker pro karcinom prsu. Zvýšené hladiny CA 15-3 se nachází jak u pacientek s časným stádiem tohoto onemocnění, tak u pacientek s pokročilým stádiem. Hladina tohoto markeru může být však vyšší i u ostatních druhů karcinomů, jako je karcinom plic a ovaria [36, 40].

3.4.8 CA 19-9 (cancer antigen)

Jedná se o glykolipid nazývaný též GICA (Gastrointestinal Cancer Antigen). Největší význam má u karcinomu pankreatu. Dobré výsledky dává u karcinomu žlučových cest, ale také u mucinózního karcinomu ovaria. Zvýšené hladiny tohoto markeru se také nachází u kolorektálního karcinomu, u karcinomu žaludku a při onemocnění štítné žlázy [25, 36, 41].

3.4.9 CA 72-4 (cancer antigen)

CA 72-4 je antigen z řady nádorových markerů charakterizovaných pomocí monoklonálních protilátek. Velmi dobré výsledky dává u mucinózního karcinomu ovaria. Senzitivita je 47–80 % [21]. Nejčastěji se však používá u karcinomu žaludku [39].

3.4.10 CA 50 (cancer antigen)

Je to marker velmi podobný markeru CA 19-9. Zvýšené hodnoty se nachází u karcinomu jícnu, žaludku, pankreatu, jater, ovaria, prsu. Používá se k monitorování karcinomu ovaria v kombinaci s CA125 [30].

3.4.11 SMRP (soluble mesothelin-related peptides)

Je to marker, který patří do mezotelinové rodiny solubilních proteinů. Slouží k diagnostice mezoteliomu pleury. Je také vhodný k monitorování tohoto onemocnění. Hladiny se mění v závislosti na velikosti nádoru. Zvýšení tedy může znamenat progresi nádoru. Gen pro mezotelin se nachází na 16. chromozomu. Tento marker může být také zvýšen u karcinomu ovaria [42–44].

3.4.12 HE4 (Human Epididymis Protein-4)

Aby byly výsledky přesnější a aby byly nádory objeveny dříve než ve třetím stádiu onemocnění a aby nedošlo k velkému počtu zbytečných operací, je potřeba hledat nové markery, které jsou citlivé a specifické. Vědci objevili nový marker HE4, který se může používat pro diagnostiku jak samostatně, tak v kombinaci s CA125 [13, 28].

Human Epididymis Protein-4 je protein o molekulové hmotnosti 20–25 kDa [45]. Paek a kol. (2011) však uvádí, že HE4 je protein s molekulovou hmotností 11 kDa [3]. HE4 je také známý jako WAP-type four disulphide core 2 (WFDC2) a patří do skupiny proteinů označovaných jako “WHEY ACIDIC FOUR-DISULFIDE CORE (WFDC)”. Poprvé byl objeven v epitelu distálního nadvarlete. Vysoké plazmatické hodnoty lze nalézt v séru pacientek s karcinomem ovaria. HE4 jako samotný nebo v kombinaci s CA125 ukázal nejvyšší citlivost zejména v časně fázi karcinomu ovaria. V normální tkáni, včetně ovaria, je jeho hladina nízká [1, 4, 6, 8, 13, 28, 29, 46, 47].

HE4 byl také nalezen u jiných malignit endometria a především u plicních adenokarcinomů. Studie naznačují, že HE4 má podobnou citlivost jako CA125, ale větší specifitu u pacientů s gynekologickými malignitami ve srovnání s pacienty s benigním gynekologickým onemocněním [2].

HE4 je slibný marker pro časnou detekci zhoubných nádorů ovaria s potenciálem odlišit ženy s karcinomem od žen zdravých nebo s benigním onemocněním. 32 % žen, s karcinomem ovaria, které neměly zvýšené hladiny CA125, měly zvýšené hladiny HE4 [12]. Jak již bylo zmíněno, HE4 vykazuje vysokou senzitivitu v časných stádiích onemocnění. Je tedy vhodný pro detekci raných fází karcinomu ovaria, kde prognóza pacientek je příznivá. Využívá se ke sledování průběhu choroby u pacientek s ovariálním karcinomem, progresi onemocnění a sledování účinnosti terapie [12, 29].

Vzhledem k tomu, že HE4 má molekulovou hmotnost 25 kD vědci předpokládali, že může být detekován v moči [48].

HE4 byl poprvé stanoven pomocí Northern blot analýzy [49].

3.5 Kombinace nádorových markerů a jejich vliv na citlivost stanovení

Jak již bylo zmíněno, citlivost a specifita dosud nejčastěji stanovovaného markeru CA125 nejsou dostatečně vysoké, aby karcinom ovaria byl detekován včas. Proto jsou využívány kombinace markerů (tabulka 3 a 4), pomocí nichž by mohl být karcinom ovaria detekován včas. Nejvyšší citlivost zejména v časně fázi karcinomu ovaria vykazuje HE4 jako samotný nebo v kombinaci s CA125 [1].

Nejčastějšími metodami, které se používají ke stanovení nádorových markerů, jsou imunochemické metody. K vyšetření nádorových markerů se nejčastěji využívá krev, ale v některých případech lze využít i moč [6, 8, 13, 33, 49–52].

Holcomb a kol. (2011) zkoumali, jak se citlivost a specifita projeví v kombinaci CA125 a HE4 a jakou citlivost bude mít stanovení jednotlivých markerů. Citlivost, specifita a negativní, pozitivní prediktivní hodnoty byly vypočteny pro CA125 a HE4 k detekci nádorů, a to pro ženy jak s benigním, tak invazivním epitelálním karcinodem ovaria [53].

Moore a kol. (2008) ve svých pracích také popisují využití kombinace několika nádorových markerů, kde vysokou citlivost vykazují kombinace CA125 + HE4 + CA 72-4 a kombinace CA125 + HE4 + SMRP (soluble mesothelin-related peptides). Z údajů z tabulky 3 je patrné, že již v I. stádiu onemocnění vykazuje HE4 v porovnání s ostatními nádorovými markery nejvyšší citlivost. Při využití kombinace několika markerů vykazuje nejvyšší citlivost kombinace CA125 + HE4 + SMRP + CA 72-4. V tabulce 4 jsou uvedeny citlivosti jednotlivých markerů nebo jejich kombinací na určitých hladinách specifity. V případě analýzy samostatného markeru vykazuje nejvyšší citlivost HE4. Při využití kombinace několika nádorových markerů vykazuje nejvyšší citlivost kombinace CA125 + HE4 + CA 72-4 [42, 43].

Tabulka č. 3: Citlivost nádorových markerů pro I. stádium karcinomu ovaria (převzato z: [42])

KOMBINACE MARKERŮ	90 % specificita	95 % specificita	98 % specificita
CA125	23, 1 %	15, 1 %	7, 7 %
HE4	46, 2 %	45, 9 %	30, 8 %
SMRP	30, 8 %	30, 3 %	15, 4 %
CA 72-4	23, 2 %	23, 1 %	23, 1 %
CA125 + HE4	46, 1 %	39, 5 %	38, 4 %
CA125 + CA 72-4	30, 7 %	30, 0 %	23, 1 %
CA125 + HE4 + CA 72-4	46, 1 %	38, 4 %	38, 4 %
CA125 + HE4 + SMRP + CA 72-4	53, 4 %	38, 4 %	38, 4 %

Tabulka č. 4: Citlivost nádorových markerů pro všechny typy a stádia karcinomu ovaria (převzato z: [42])

KOMBINACE MARKERŮ	90 % Specificita	95 % Specificita	98 % Specificita
CA125	61, 2 %	43, 3 %	23, 9 %
HE4	77, 6 %	72, 9 %	64, 2 %
SMRP	61, 2 %	53, 7 %	43, 3 %
CA 72-4	49, 2 %	35, 0 %	22, 0 %
CA125 + HE4	80, 7 %	76, 4 %	71, 6 %
CA125 + SMRP	74, 6 %	56, 8 %	50, 7 %
CA125 + CA 72-4	62, 7 %	45, 1 %	31, 4 %
HE4 + SMRP	80, 6 %	71, 6 %	65, 7 %
HE4 + CA 72-4	77, 6 %	70, 2 %	67, 2 %
CA125 + HE4 + SMRP	80, 6 %	74, 7 %	71, 7 %
CA125 + HE4 + CA 72-4	82, 1 %	78, 8 %	71, 5 %
CA125 + HE4 + SMRP + CA 72-4	82, 1 %	74, 7 %	71, 6 %
CA125 + HE4 + CA 72-4 + Urine SMRP	80, 3 %	73, 8 %	70, 5 %
CA125+HE4+CA 72-4+SMRP+Osteopontin	80, 7 %	79, 1 %	71, 7 %

HE4 jako jediný překonal všechny nádorové markery s výjimkou kombinace CA125 a HE4 u pacientů s II.–IV. stádiem nemoci. Tato zjištění naznačují, že samostatný HE4 a kombinace HE4 a CA125, stejně jako SMRP, jsou vynikající kandidáti pro využití v detekci onemocnění [43].

Podobné výsledky uvádí i Holcomb a kol. (2011), kde citlivost kombinace HE4 a CA125 je také mnohem větší, než při použití těchto markerů samostatně. Ve všech publikovaných vědeckých pracích se vědci shodují, že kombinace HE4 a CA125 má největší citlivost [53].

4 Metody stanovení nádorových markerů

Mezi imunochemické metody, které se využívají při analýze nádorových markerů, patří EIA (Enzyme Immuno Assay), ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), ECLIA (elektrochemiluminiscence), chemiluminiscence a také imunohistochemické a imunofluorescenční metody. Nádorové markery karcinomu ovaria se dají stanovit jak ze séra, tak z moče [6, 8, 13, 33, 48–52].

Dalším možným stanovením je stanovení pomocí Protein Chip systému, který je založen na interakci antigenu s protilátkou, která je navázána na pevném nosiči. Tímto testem může být testováno až 12 markerů a až 42 vzorků současně. Výhodou tohoto testu je vysoká citlivost a specifita, rychlá detekce a nízká cena (obrázek 1) [54].



Obrázek č. 1: Protein Chip systém (převzato z: [54]).

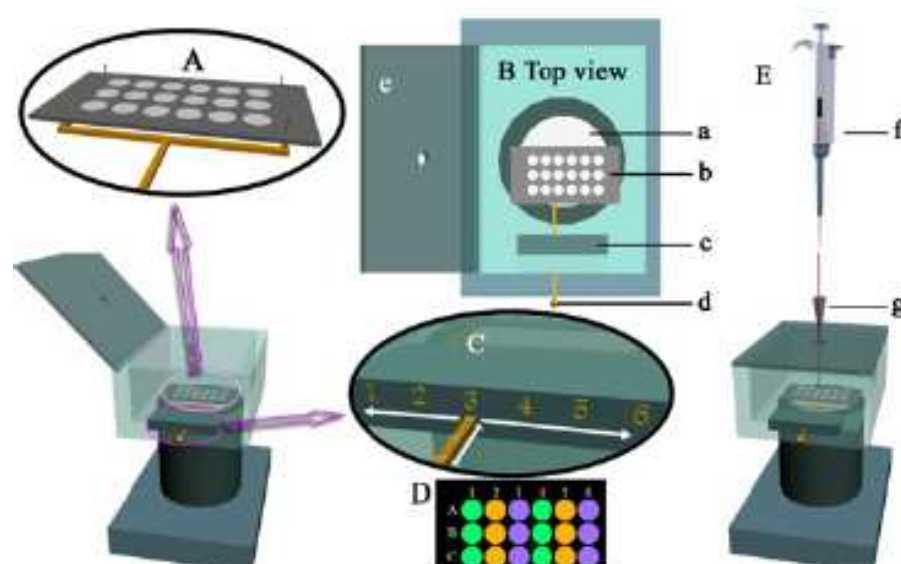
4.1 ELISA a EIA

Metoda ELISA je nejčastější metodou stanovení hladin nádorových markerů v séru. ELISA byla také postavena k měření HE4 a používá se k testování sér od žen po menopauze s karcinomem ovaria [48, 50, 55].

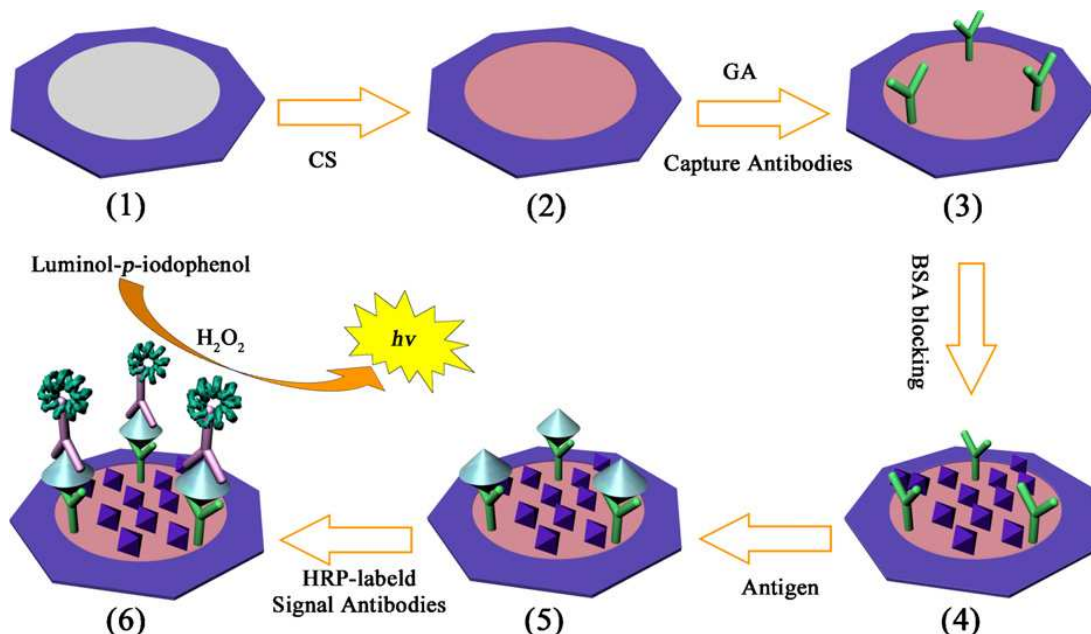
Hellström a kol. (2003) zavedli ELISA metodu pro stanovení HE4, a to s využitím monoklonálních protilátek získaných imunizací myši HE4 fúzním proteinem. ELISA může vylepšit detekci u pacientů s karcinomem ovaria. Při studii prokázali, že HE4 má výhodu oproti CA125, protože je méně často pozitivní u pacientek s nemaligním onemocněním [13].

Duffy (2007) ve své studii popisuje test ELISA, který byl použit pro stanovení sérových hladin markerů CEA, CA 15-3, CYFRA 21-1, hCG, AFP, PSA a CA125. Tímto testem lze stanovit pouze velmi malé množství markerů dohromady. Pomocí nové technologie microarray stanovili více markerů dohromady. Microarray byla provedena pro několik typů karcinomů, kdy nejslibnější výsledky byly získány u karcinomu prsu [24].

Wang, Ge a kol. (2012) ve své studii popisují možnost jak stanovit marker CA125, a to metodou sendvičové CL-ELISA (chemiluminiscence ELISA) na μ PADs (mikrodestičky). Schéma a postup stanovení tohoto papírkového CL-testu ELISA je znázorněno na obrázcích 2 a 3 [52].

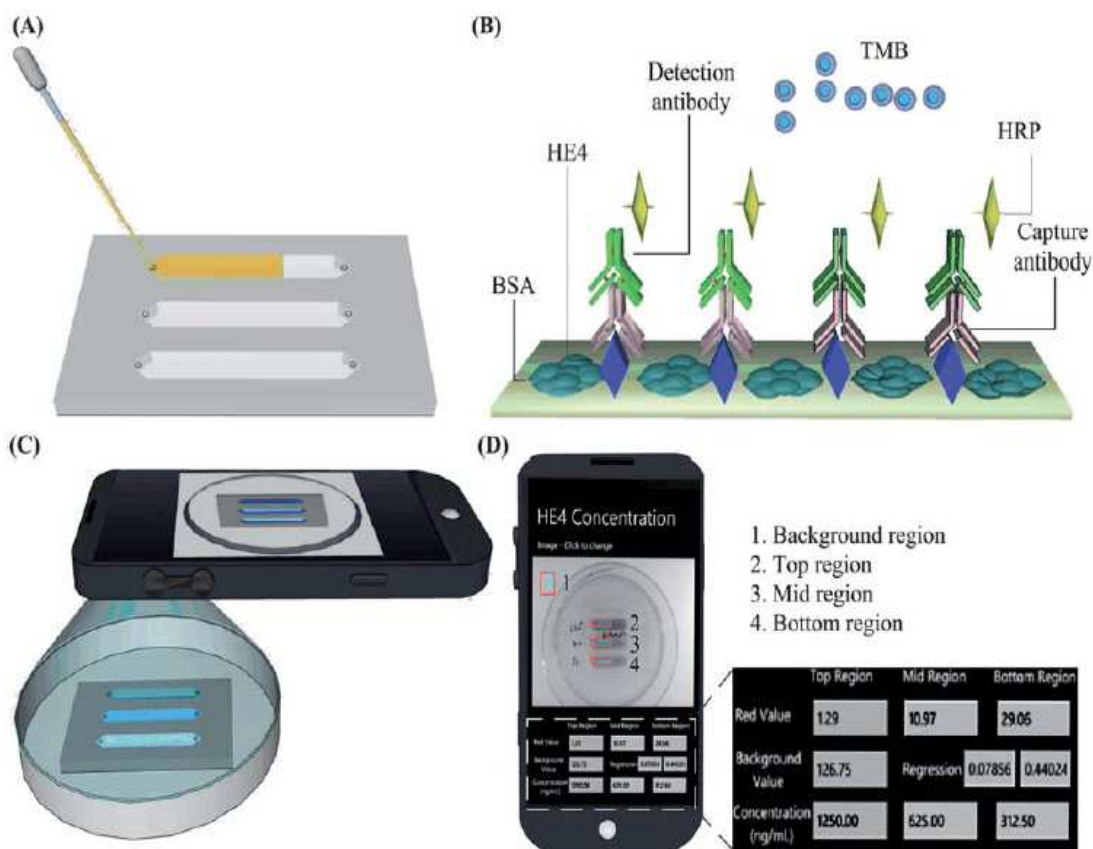


Obrázek č. 2: CL-test ELISA. (A): Zvětšený obrázek papíru immunoplate (B): Pohled shora na kazety: (a) fotonásobič, (b) papír immunoplate (c) kontrolní systém, (d) ovládání destičky. (C): detail řídicího systému. (D): detekční schéma. (E): dávkovací systém (f) pipeta (g) gumové těsnění (převzato z: [52]).



Obrázek č. 3: Schéma principu papírové sendvičové CL-ELISA (1) Wax-screen-zóna potištěného papíru, (2) navázání chitosanu (3) zachycení protilátek na papír pomocí glutaraldehydu (4) blokace pomocí BSA (5) inkubace s antigenem a jeho vychytání (6) přidání enzymaticky značené protilátky (HRP) a následně přidavek luminiscenčního substrátu (převzato z: [52]).

Novinkou, jak stanovit karcinom ovaria v moči pomocí biomarkeru HE4, je mikročip ELISA, který využívá přenosný detekční systém. Mobilní zařízení umožnilo okamžité zpracování výsledků ELISA. Wang a kol. (2011) ve své studii použili nelitografické techniky pro výrobu mikročipů z polymetylmakrylátu (PMMA) a oboustranné lepicí fólie. Jak je ukázáno na obrázku 4, vzorek moče je nanesen na destičku velikosti mikročipu. Velikost mikročipu je $4 \times 7,5 \times 3,225 \text{ mm}^3$ (A). Na mikročipu je bílkovinný biomarker, tj. HE4 detekován pomocí sendvičové ELISA (B). Jakmile je HE4 zachycen imobilizovanou specifickou protilátkou na čipu a je přidána křenovou peroxidázou (HRP) značená sekundární protilátka proti HE4, vytvoří se sendvičový imunokomplex. Vzniklý imunokomplex je detekován kolorimetricky po přidavku chromogenního substrátu. Výsledek je zaznamenán přenosným zařízením, v tomto případě fotoaparátem mobilního telefonu (C) [50].

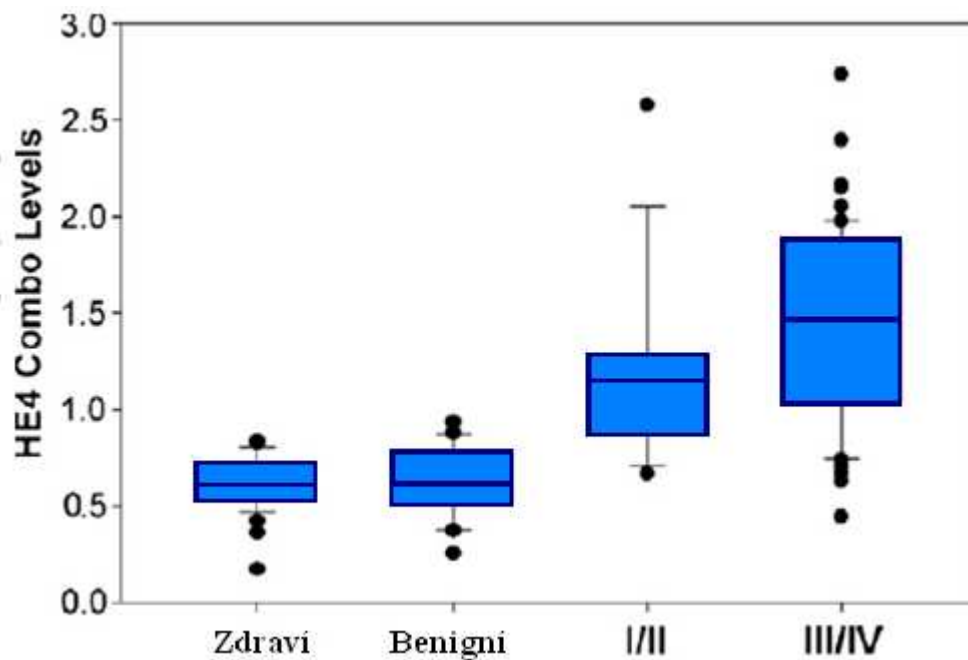


Obrázek č. 4: Schéma mikročipů ELISA založené na kolorimetrické detekci HE4 markeru karcinomu ovaria z moči (převzato z: [50])

Andersen a kol. (2010) se ve své studii zabývali především sledováním hladin HE4 a CA125 u žen po menopauze. Studie zahrnovala 74 žen s karcinomem ovaria a 137 zdravých žen jako kontroly. Hladiny CA125 a HE4 byly stanoveny sendvičovou ELISA metodou s využitím monoklonálních protilátek. Ze 74 pacientek bylo 6 žen s mucinózním karcinomem, 6 žen s buněčným karcinomem, 7 žen s karcinomem endometria, 5 žen s jinými typy adenokarcinomů a 50 žen se serózním karcinomem. HE4 díky vysoké citlivosti jako první překonal CA125. Nejvyšší citlivosti pak dosahuje použití kombinace CA125 s HE4 [47].

Hellström a kol. (2010) ve své studii stanovovali hladiny HE4 v moči. Předpokládali, s ohledem na molekulovou hmotnost, že HE4 může přecházet do moči. Použili vzorky moči od 36 leté zdravé ženy (zdravá kontrola), od 20-ti pacientek s benigním gynekologickým onemocněním, od 15-ti pacientek s karcinomem ovaria (I.–II. stádium) a od 64-ti pacientek s pokročilým stádiem karcinomu ovaria (III.–IV. stádium). HE4 hladiny byly měřeny pomocí metody ELISA. Hladiny HE4 u žen s pokročilým či časným stádiem karcinomu ovaria byly výrazně zvýšené ve srovnání

s hladinami HE4 u žen s benigním onemocněním či u žen zdravých (obrázek 5). Prokázali, že HE4 společně s mesothelinem, MUC16 (CA125) a MMP-7 (Matrix metalloproteinases 7), je jeden z velmi slibných markerů pro diagnostiku ovariálního karcinomu. Navíc detekce markerů v moči je nejméně invazivní způsob získání vzorku oproti analýze v séru a může usnadnit včasné odhalení pacientů s karcinomem ovaria a sledovat odpověď na léčbu [4, 18, 48].



Obrázek č. 5: Hladiny HE4 u žen s pokročilým či časným stádiem karcinomu ovaria (převzato z: [48])

Moore a kol. (2012) se ve své studii zabývali stanovením hladin markerů HE4 a CA125 u 1042 diagnostikovaných žen s benigním gynekologickým onemocněním. Z toho 449 (43 %) bylo žen před menopauzou a 593 (57 %) bylo žen po menopauze. Průměrný věk všech žen byl 50 let (rozmezí 18–89). Ženy před menopauzou byly ve věku v rozmezí 18–56 let a ženy po menopauze v rozmezí 39–89 let. Sérové hladiny těchto markerů byly změřeny pomocí metody EIA. Analýza 1042 žen s benigním onemocněním ukázala, že sérové hladiny HE4 jsou méně často zvýšené u benigního onemocnění ve srovnání s CA125 [29].

Hellström a kol. (2003) provedli testy na vzorcích séra 37 pacientek s karcinomem ovaria (7 v časně fázi, 30 v pozdní fázi), 65 zdravých kontrol a 19 s benigním ovariálním onemocněním. Všechny pacientky byly náhodně vybrány. Vzorky pacientek s karcinomem ovaria a benigními onemocněními byly získány před operací a další léčbou. Vzorky zdravých kontrol byly získány v rámci pokusného výzkumu. Všechna

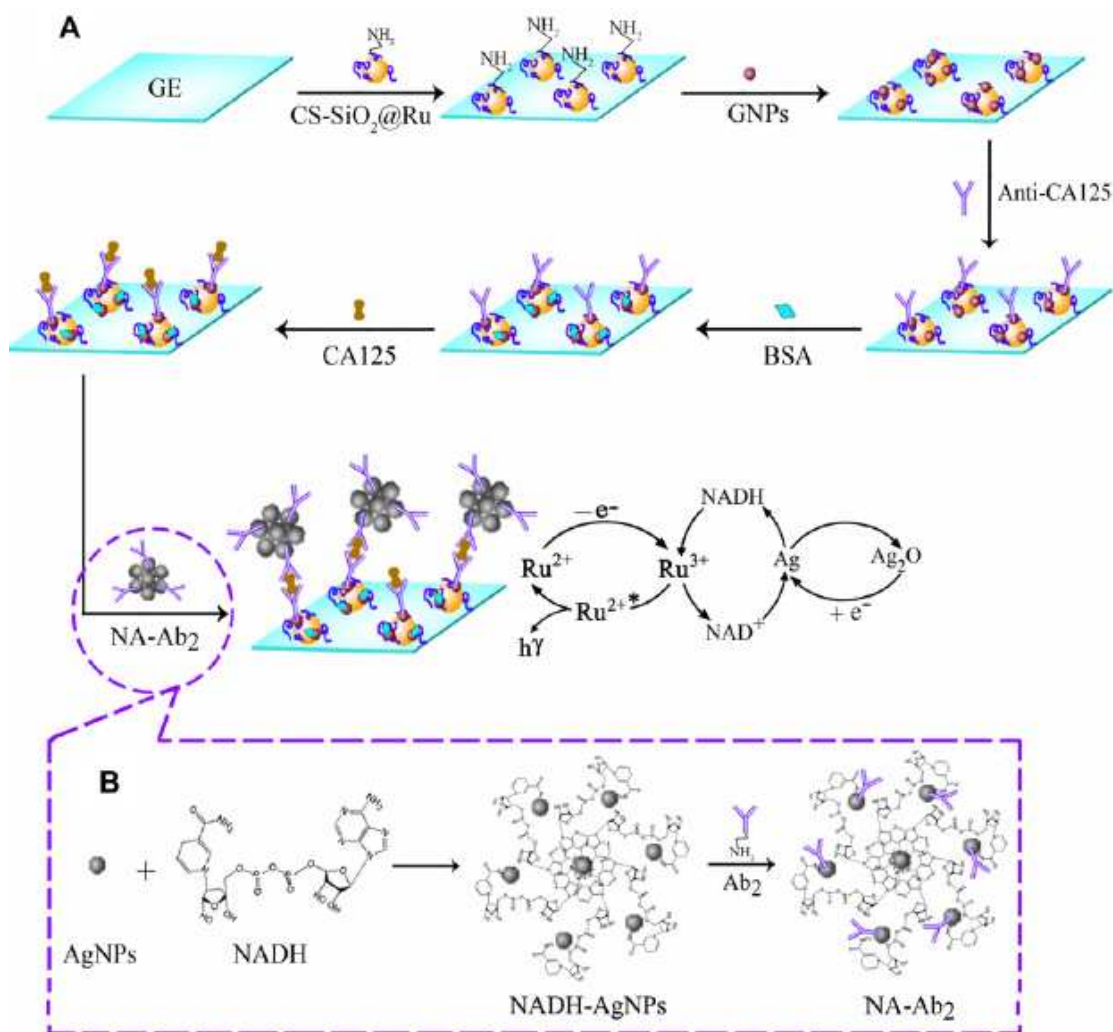
séra byla testována na CA125 pomocí metody ELISA. CA125 ani HE4 nebyly perfektními ukazateli karcinomu ovaria. HE4 neuspělo v odhalení 7 případů a CA125 neodhalilo 8 případů. Výsledky ukazují, že HE4 je však lepší než CA125 v rozlišení pacientek s karcinomem ovaria od pacientek s benigním onemocněním ovaria [13].

Coticchia a kol. (2011) svoji studii zaměřili na MMP-9 (Matrix metalloproteinases 9) a MMP-2 (Matrix metalloproteinases 2), jejichž hladiny mohou být také zvýšeny u žen s karcinomem ovaria. Studie byla zaměřena na kritické skupiny pacientek. Hodnoty MMP-9, MMP-2 byly stanoveny v moči pomocí metody ELISA. MMP-9, MMP-2 mohou předpovědět karcinom ovaria. Hladina MMP-2 byla vyšší u žen s karcinomem ovaria než hladina MMP-9 [14].

4.2 Elektrochemiluminiscence a chemiluminiscence

Vedle metod EIA či ELISA je pro stanovení nádorových markerů používána i elektrochemiluminiscence (ECL). Elektrochemické metody vykazují několik výhod, jako je vysoká citlivost, rychlá doba analýzy a malé množství vzorku potřebného k analýze. ECL kombinuje výhody chemiluminiscence s kontrolovatelností elektrochemie [8, 51].

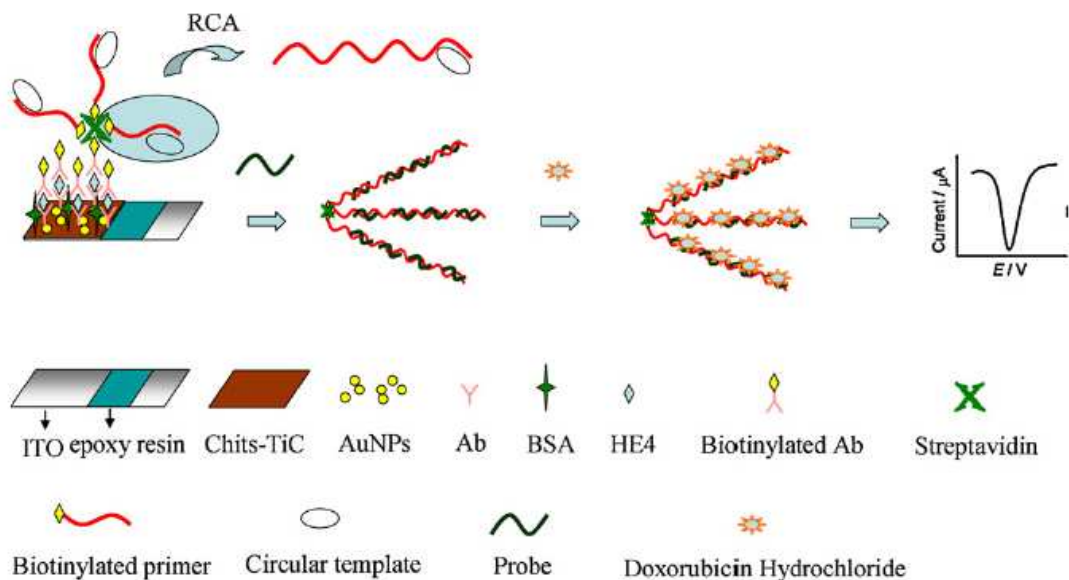
Dle článku Wang, Jina a kol. (2012) byla k sestrojení elektrochemiluminiscenčního imunosenzoru pro detekci markeru CA125 použita nová metalo-organická nanosloučenina. Metalo-organické sloučeniny jsou jedním z nanomateriálů obsahující organické molekuly ve spojení s kovy. Stříbrné nanočástice (AgNPs) sloužily jako kovové složky a NADH sloužilo jako organická složka. Imunosenzory mohou sloužit k ultracitlivé detekci biomarkerů. Imunosenzory jsou založené na tvorbě sendvičového imunokomplexu, jak je znázorněno na obrázku 6. V této konkrétní aplikaci bylo před modifikací GE (gold electrode = zlatá elektroda) vyčištěno aluminiovou kaší a chemicky ošetřeno ponořením do čerstvě připravené směsi H_2SO_4 a H_2O_2 (2:1) po dobu 30 sekund. Po vysušení na vzduchu byl na povrch takto ošetřené elektrody nanosen Ru-SiO₂ v chitosanu (CS-SiO₂@Ru). Poté povrch elektrody po dobu 1 hodiny pokrývalo 20 μ l zlatého koloidu. Dále bylo přidáno 20 μ l primární protilátky proti CA125 (Ab₁) a inkubováno s GNPs filmem přes noc, následovalo blokování povrchu 0,5 % BSA po dobu 15 minut. Elektroda s modifikovaným povrchem byla inkubována s 20 μ l čerstvě připravené NA-Ab₂ (NADH-AgNPs = NA, Ab₂ = sekundární protilátka) po dobu 50 minut [51].



Obrázek č. 6: (A) Sendvičové provedení imunosenzoru, (B) Tvorba NADH-AgNPs (NA) nanokompozitů a biokonjugace se sekundární protilátkou (Ab₂) a NA nanokompozity (převzato z: [51])

Escudero a kol. (2011) využili chemiluminiscenční enzymovou imunoanalýzu pro stanovení hladin HE4 a CA125 v séru u 66 zdravých žen (20–91 let) z toho bylo 34 žen před menopauzou a 32 žen po menopauze, u 285 pacientek s benigním gynekologickým onemocněním (17–90 let), 143 pacientek s aktivním gynekologickým karcinomem (23–87 let), 33 pacientek bez aktivního onemocnění (NED) po radikální léčbě (23 žen s adenokarcinomem endometria nebo endocervixu, 6 žen se spinocelulárním karcinomem děložního hrdla a 4 ženy s karcinomem ovaria). Výrazně vyšší hladiny CA125 byly nalezeny u žen před menopauzou než po menopauze. U žen s karcinomem ovaria byla citlivost CA125 vyšší než citlivost HE4. Oba markery vykazovaly vyšší hladiny u karcinomu ovaria III. a IV. stádia než u I. a II. stádia [2].

Liu a kol. (2012) použili pro sestavení imunosenzorů nanomateriály, jako například Au nanočástice, karbonové nanotrubičky a nano hybridní materiály. Tyto materiály mají jedinečné chemické a fyzikální vlastnosti, mají velký specifický povrch, dobrou biokompatibilitu. Ve své studii použili především chitosan a titanium karbid (TiC). Au nanočástice byly potom ukotveny na povrch chitosan–TiC filmu pomocí cyklické voltametrie (CV) a takto byl vytvořen ultracitlivý elektrochemický sendvičový imunosenzor pro detekci HE4. Pracovní oblast ITO (Tin-doped indium oxide = elektroda z oxidu titaničitého dopovaného indiem) elektrody (1 cm²) byla regulována epoxidovým nosičem. Penetrovaná ITO elektroda byla ponořena do roztoku suspenze chitosan–TiC nanosloučeniny. Poté byly konjugovány AuNPs s modifikovanou ITO elektrodou. Roztok specifické protilátky proti HE4 (100 µl) byl nakapán na ITO elektrodu a poté proběhla inkubace při 37 °C po dobu 1,5 hodiny. Dále byla modifikovaná ITO elektroda ponořena do 0,25 % BSA roztoku při 37 °C na půl hodiny. HE4 standardní roztoky (100 µl) s různými koncentracemi byly naneseny na ITO elektrodu modifikovanou anti-HE4, která byla inkubována při 37 °C po dobu 2 hodin. Biotinem značená sekundární anti-HE4 protilátka (100 µl) byla potom aplikována na elektrodu a inkubována po dobu 1 hodiny. Nekongugovaný materiál byl odstraněn třemi promytími v 200 µl promývacího pufru. Sestavení imunosenzoru je znázorněno na obrázku 7. Metoda vykazuje dynamický rozsah a nízký detekční limit [8].



Obrázek č. 7: Schéma elektrochemického imunosenzoru pro detekci HE4 (převzato z: [8])

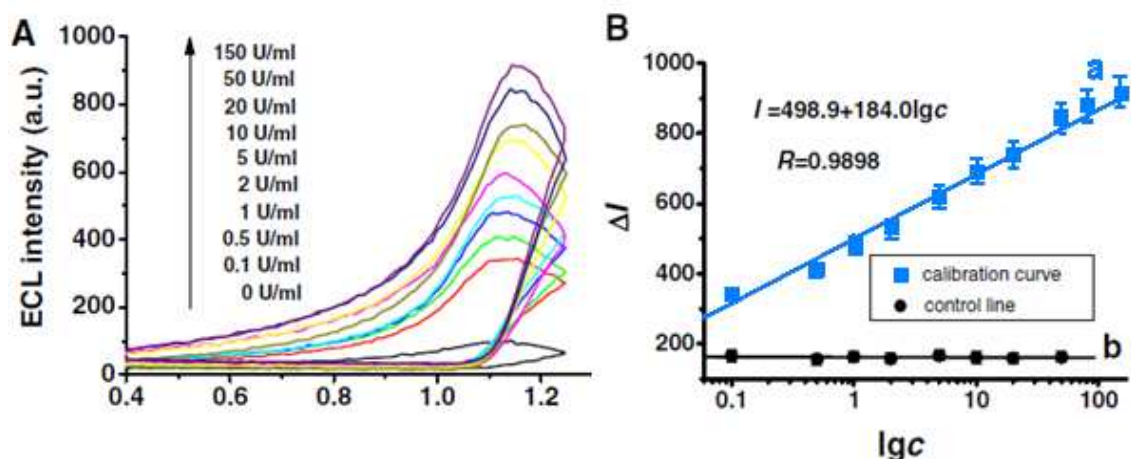
I Park a kol. (2011) ve své studii použili chemiluminiscenční analýzu pro stanovení nádorových markerů CA125 a HE4. Analytický rozsah měření byl od 0,5 do 5000 kU/l. Do studie bylo zařazeno 176 pacientek včetně 16 zdravých, 29 pacientek s karcinomem ovaria, 85 s benigním gynekologickým onemocněním, 31 s negynekologickou malignitou, 9 s gynekologickou malignitou jinou než karcinom ovaria a 6 s negynekologickým benigním onemocněním. Hladiny HE4 a CA125 byly výrazně zvýšeny u žen s karcinomem ovaria, a to ve II. a III. stádiu onemocnění. Hladiny CA125, na rozdíl od hladin HE4, byly také vyšší u žen s benigním gynekologickým onemocněním [1].

Molin a kol. (2011), Christenson a kol. (2011), Thériault a kol. (2012), Ruggeri a kol. (2011) ve svých studiích také využívají měření sérových hladin CA125 a HE4 pomocí chemiluminiscenční enzymové imunoanalýzy [2, 5, 6, 56].

Wang a kol. (2012) použili marker CA125 pro posouzení dynamického rozsahu detekce pomocí ECL imunosenzoru pro detekci tohoto markeru v séru. Intenzity ECL korespondující s rozdílnými koncentracemi analytů byly zaznamenány jako I_i (obrázek 8). Studie zahrnovala 10 vzorků z toho 7 vzorků od pacientek s raným stádiem karcinomu ovaria a 3 od zdravých žen. Přesnost detekce CA125 tímto přístupem byla porovnána s výsledky ELISA a prokázali, že výsledky elektrochemické detekce se téměř shodují s výsledky získanými pomocí metody ELISA (tabulka 6) [51].

Tabulka č. 6: Porovnání výsledků měření pro vzorky séra pomocí imunosenzoru a ELISA metody (převzato z: [51])

ČÍSLO VZORKU	IMUNOSENZOR (U/ml)	ELISA (U/ml)
1	26, 1 ± 1, 6	25, 2 ± 1, 2
2	39, 4 ± 1, 1	38, 6 ± 0, 4
3	8, 8 ± 0, 7	8, 3 ± 0, 1
4	73, 3 ± 3, 1	72, 5 ± 2, 3
5	80, 6 ± 3, 2	79, 8 ± 1, 9
6	113, 1 ± 4, 7	113, 8 ± 43, 9
7	102, 0 ± 5, 6	101, 6 ± 4, 7
8	-	-
9	-	-
10	-	-



Obrázek č. 8: (A) ECL reakce na CA125: (I_0) 0, (I_1) 0,1, (I_2) 0,5 (I_3) 1, (I_4) 2, (I_5) 5, (I_6) 10, (I_7) 20, (I_8) 50 a (I_9) 150 ml^{-1} v roztoku fosfátového pufru (pH 7, 4) při skenování rychlostí 100 mV/s. (B) Kalibrační křivka se zaznamenanou průměrnou intenzitou ECL na šestinásobek měření a počítání směrodatné odchylky jako chybové úsečky pro každou koncentraci (převzato z: [51])

4.3 Imunohistochemické metody

Další metody, které mohou být použity pro stanovení nádorových markerů HE4 a CA125 ze séra, jsou imunohistochemické metody. Takto byly zjištěny nejčastěji přítomné proteiny u karcinomu ovaria, jako jsou Mucin, EpCAM, Mesothelin a CD9 [49].

Duffy (2007) se ve své studii také zmiňuje o imunohistochemické metodě, která slouží pro stanovení nádorových markerů ze séra. Tímto testem lze stanovit pouze velmi malé množství markerů dohromady [24].

Dle Drapkina a kol. (2005) byla pro stanovení HE4 imunohistochemickou metodou použita králičí polyklonální protilátka. Ke značení byla použita křenová peroxidáza [49].

4.4 Imunofluorescenční metody

Další metoda, která může být použita pro detekci nádorových markerů HE4 a CA125, je metoda imunofluorescence. Touto metodou byly analyzovány buněčné linie SKOV-3, CaoV3 a OVCAR-5 (Ovary Adenocarcinoma). Jsou to buňky, které byly izolovány z ovaria. Tyto buňky byly označeny králičí polyklonální protilátkou proti HE4. Následně byla přidána protilátka značená fluorochromem. Fluorescence byla pozorována mikroskopem [49].

Studie Thériault a kol. (2012) se zabývá především buněčnými liniemi SKOV-3, OVCAR-3. Připravená sklíčka pro analýzu, která obsahovala buněčné linie, byla

inkubována s primární protilátkou v blokovacím pufru při pokojové teplotě. Poté se promyla v PBS a inkubovala se při pokojové teplotě s kozími fragmenty IgG. Po umytí byla sklíčka inkubována po dobu 2 minut v 4,6 diamidino-2-fenyl indolu. Po promytí byly výsledky pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu [5].

4.5 Studie s buněčnými liniemi

Čtrnáct prokázaných buněčných linií karcinomu ovaria bylo použito k vyhodnocení úrovně mRNA a proteinové exprese markeru HE4. Úkolem této studie bylo zjistit, zda může být marker HE4 použit k diagnostice karcinomu ovaria. Mezi buněčné linie prokázané u karcinomu ovaria patří OVCAR-5, OVCAR-8, IGROV-1, OVCA420, OVCA429, MCAS, TOV-112D, CaoV3, OVCAR-3, SKOV-3, OV-90, ES-2, TOV-21g, SNU-251, který skrývá BRCA-1 mutaci [49].

Jak již bylo zmíněno buněčnými liniemi, především OVCAR-3, SKOV-3, se zabývá i studie Thériaultové a kol. (2012). Stanovují se imunofluorescenční metodou [5].

Makridakis, Vlahou (2010) se ve své studii zmiňují o buněčných liniích OVCAR-3, CaoV3. Markery HE4 a CA125 byly zjištěny v extracelulárním prostoru těchto buněk [7].

4.6 Využití genů

Vedle analýzy vlastních proteinových nádorových markerů je možné využít molekulárně biologických metod, založených na identifikaci genů kódujících nádorové markery za použití takových technik, jako je např. analýza genové exprese nebo mikroanalýza cDNA. Druhá zmíněná metoda byla aplikována k identifikaci genů WFDC2 a MSLN (mesothelin). Výchozí microarray studie vyhledávající geny kódující markery karcinomu ovaria, byly rozšířeny o membránové cDNA array a cDNA array na skle. Bylo identifikováno 13 vzorků séra od žen s karcinomem ovaria, 2 vzorky od žen s benigním nádorem ovaria a 17 vzorků od žen s normální tkání. Byla provedena PCR (polymerázová řetězová reakce), aby bylo charakterizováno 64 nejdůležitějších genů u karcinomu ovaria. Ukázalo se, že dva z nich, WFDC2 (HE4) a MSLN, mají největší selektivitu pro karcinom ovaria [13].

5 Odhad rizika vzniku kacinomu ovaria

Pro odhad rizika epiteliálního karcinomu ovarí byl vytvořen algoritmus tzv. ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm). Algoritmus bere v potaz analytické hodnoty hladin HE4 a CA125, ale také fyziologický stav pacientky (zda je v menopauze či nikoliv). Tímto algoritmem se zabývalo několik prací. Pro analýzu sérových nádorových markerů jsou použity vzorky pacientek po menopauze a před menopauzou. Hodnoty CA125 se v testovaných souborech nelišily mezi skupinami žen před menopauzou a po menopauze. V každé skupině byla jedna hodnota zvýšena nad obvykle používaný cut-off 35 U/ml. Hodnoty HE4 byly vyšší u postmenopauzálních žen. Dalším krokem je určení tzv. prediktivní pravděpodobnosti (PP), která je vypočtena pro každou pacientku. Citlivost, specifická, pozitivní prediktivní hodnoty (PPV) a negativní prediktivní hodnoty (NPV) byly počítány pro ženy po a před menopauzou podle níže uvedeného vzorce [2, 6, 45, 55, 57].

Cílem studie Molina a kol. (2011) bylo zhodnotit HE4 a CA125 v séru zdravých pacientek a pacientek s benigním a maligním gynekologickým onemocněním a srovnat užitečnosti těchto tří parametrů (HE4, CA125 a ROMA) pro diagnostické účely u pacientek s gynekologickým onemocněním. ROMA měla nejvyšší citlivost hlavně u žen po menopauze [2].

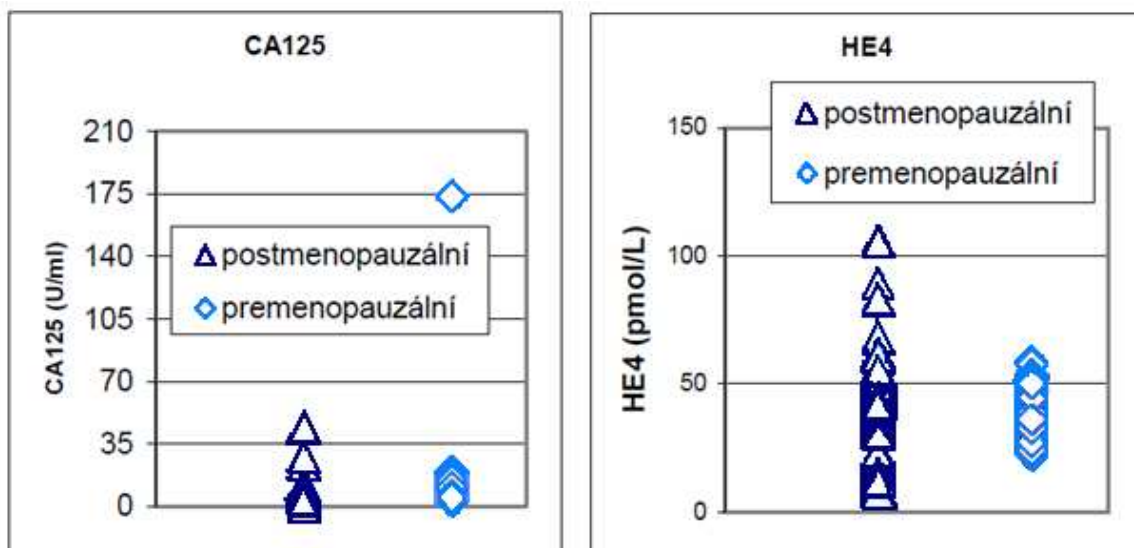
Premenopauze: Predictive Index (PI) = $-12.0 + 2.38 \cdot \text{LN}(\text{HE4}) + 0.0626 \cdot \text{LN}(\text{CA125})$

Postmenopauze: Predictive Index (PI) = $-8.09 + 1.04 \cdot \text{LN}(\text{HE4}) + 0.732 \cdot \text{LN}(\text{CA125})$

ROMA = prediktivní pravděpodobnost se dá vypočítat podle vzorce:

$$\text{hodnotaROMA}(\%) = \frac{\exp(PI)}{[1 + \exp(PI)]} \cdot 100$$

Pokud je hodnota ROMA u žen před menopauzou $\geq 11,4 \%$, mluvíme o vysokém riziku nálezu epiteliálního karcinomu ovaria. Pokud je ROMA $< 11,4 \%$, mluvíme o nízkém riziku nálezu tohoto karcinomu. U žen po menopauze mohou být hodnoty ROMA $\geq 29,9 \%$, tj. vysoké riziko nálezu epiteliálního karcinomu ovaria, nebo mohou být hodnoty ROMA $< 29,9 \%$, potom mluvíme o nízkém nálezu tohoto karcinomu. Hodnoty CA125 a HE4 u žen před a po menopauze jsou znázorněny v obrázku 9 [45].



Obrázek č. 9: Hodnoty CA125 a HE4 ve skupině žen před menopauzou a žen po menopauze (převzato z: [45])

6 Závěr

Tato práce je rešerší zabývající se nádorovými markery používanými k diagnostice karcinomu ovaria a jejich metody stanovení. Předmětem práce byl přehled všech markerů, které jsou pro diagnostiku běžně používány. Nádorové markery karcinomu ovaria se obvykle analyzují v séru pacientek, a to různými, převážně imunochemickými metodami.

Práce byla podrobněji zaměřena především na markery HE4 a CA125. CA125 byl dosud považován za nejspolehlivější marker pro toto onemocnění. Je však spojen s vysokou falešnou pozitivitou u žen s benigním gynekologickým onemocněním. Aby byly výsledky přesnější a aby byly nádory objeveny dříve, než ve třetím stádiu onemocnění, je nutné hledat nové markery, které jsou citlivé a specifické.

Takovým markerem může být nově objevený marker HE4, který se může používat jako samostatně, tak v kombinaci s CA125. Ve všech publikovaných vědeckých pracích se vědci shodují, že HE4 je slibný marker pro detekci karcinomu ovaria a má největší citlivost v kombinaci s CA125.

Human Epididymis Protein-4 je protein o molekulové hmotnosti 20–25 kD. Stanovuje se imunochemickými metodami, a to především metodou EIA, ELISA, ECLIA. Lze jej stanovit ze séra, ale i z moče, což je nejméně invazivní způsob získávání vzorku.

Zavedení rutinní analýzy HE4 u rizikových žen současně s markerem CA125 by v budoucnu mělo zlepšit diagnostiku případného nádorového onemocnění v časně fázi onemocnění, a tím zvýšit procento žen, které přežijí.

7 Seznam použité literatury

1. PARK, Yongjung, LEE, Jong-Han, HONG, Duck, Jin, LEE, Eun, Young, KIM, Hyon-Suk: Diagnostic performances of HE4 and CA125 for the detection of ovarian cancer from patients with various gynecologic and non-gynecologic diseases, *Clinical Biochemistry*, (2011), **44**, s. 884–888.
2. MOLINA, Rafael, ESCUDERO, Jose M, AUGÉ, Jose M, XAVIER, Filella, FOJ, Laura, TORNÉ, Aureli, LEJARCEGUI, Jose, PAHISA, Jaume: HE4 a novel tumour marker for ovarian cancer: comparison with CA125 and ROMA algorithm in patients with gynaecological diseases, *Tumor Biology*, (2011), **32**, s. 1087–1095.
3. PAEK, Jiheum, LEE, San-Hui, YIM, Ga-Won, LEE, Maria, KIM, Young-Jae, NAM, Eun-Ji, KIM, Sang-Wun, KIM, Young-Tae: Prognostic significance of human epididymis protein 4 in epithelial ovarian cancer, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, (2011), **158**, s. 338–342.
4. HUSSEINZADEH, Nader: Status of tumor markers in epithelial ovarian cancer has there been any progress? A review, *Gynecologic Oncology*, (2011), **120**, s. 152–157.
5. THÉRIAULT, Catherine, PINARD, Maxime, COMAMALA, Marina, MIGNEAULT, Martine, BEAUDIN, Julie, MATTE, Isabelle, BOIVIN, Marianne, PICHE, Alain, RANCOURT, Claudine: MUC16 (CA125) regulates epithelial ovarian cancer cell growth, tumorigenesis and metastasis, *Gynecologic Oncology*, (2011), **121**, s. 434–443.
6. RUGGERI, Giuseppina, BANDIERA, Elisabetta, ZANATTI, Laura, BELLOLI, Silvana, RAVAGGI, Antonella, ROMANI, Chiara, BIGNOTTI, Eliana, TASSI, Renata A., TOGNON, Germana, GALLI, Claudio, CAIMI, Luigi, PECORELLI, Sergio: HE4 and epithelial ovarian cancer: Comparison and clinical evaluation of two immunoassays and a combination algorithm, *Clinica Chimica Acta*, (2011), **412**, s. 1447–1453.
7. MAKRIDAKIS, Manousos, VLAHOU, Antonia: Secretome proteomics for discovery of cancer biomarkers, *Journal of proteomics*, (2010), **73**, s. 2291–2305.
8. LU, Lingsong, LIU, Bei, ZHAO, Zhaohui, MA, Cuixia, LUO, Peng, LIU, Chenggui, XIE, Guoming: Ultrasensitive electrochemical immunosensor for HE4 based on rolling circle amplification, *Biosensors and Bioelectronics*, (2012), **33**, s. 216–221.

9. DYLEVSKÝ, Ivan. *Funkční anatomie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. 544 s. ISBN 978-80-247-3240-4.
10. ABRAHÁMOVÁ, Jitka, VORLÍČKOVÁ, Hilda. *Klinická onkologie pro sestry*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006. 328 s. ISBN 80-247-1716-6.
11. ŽALOUDÍK, Jan. *Vyhněte se rakovině, aneb prevence zhoubných nádorů pro každého*. 1. vyd. Praha: Grada, 2008. 192 s. ISBN 978-80-247-2307-5.
12. www.diag.cz/uploads/letak-ovarialni-marker-HE4.pdf [cit. 2012-16-05]
13. HELLSTRÖM, Ingegerd, RAYCRAFT, John, HAYDEN-LEDBETTER, Martha, et al.: The HE4 (WFDC2) Protein Is a Biomarker for Ovarian Carcinoma, *Cancer Research*, (2003), **63**, s. 3695–3700.
14. COTICCHIA, Christine M., CURATOLO Adam S., ZURAKOWSKI, David, YANG, Jiang, DANIELS, Kathryn E., MATULONIS, Ursula A., MOSES, Marsha A.: Urinary MMP-2 and MMP-9 predict the presence of ovarian cancer in women with normal CA125 levels, *Gynecologic Oncology*, (2011), **123**, s. 295–300.
15. OTRUBOVÁ, Jana. *Klinická PET a PET/CT*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009. 207 s. ISBN 978-80-7262-619-9.
16. CIBULA, David, PETRUŽELA, Luboš. *Onkogynekologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. 616 s. ISBN 978-80-274-2665-6.
17. PAN, Hun-Shan, LEE, Shioh-Lin, HUANG, Lee-Wen, CHEN, Yen-Kung: Combined positron emission tomography–computed tomography and tumor markers for detecting recurrent ovarian cancer, *Gynecologic Oncology*, (2011), **283**, s. 335–341.
18. SCHUMMER, Michèl, DRESCHER, Charles, FORREST, Robin, GOUGH, Shirley, THORPE, Jason, HELLSTRÖM, Ingegerd, HELLSTRÖM, Karl, Erik, URBAN, Nicole: Evaluation of ovarian cancer remission markers HE4, MMP7 and Mesothelin by comparison to the established marker CA125, *Gynecologic Oncology*, (2012), **125**, s. 65–69.
19. BECKER, Horst, D, HOHENBERGER, Werner, SCHLAG, Michael, Peter, JUNGINGER, Theodor. *Chirurgická onkologie*. Praha: Grada, 2005. 854 s. ISBN 978-8024707204.

20. PONCELET, C., FAUVET, R., YAZBECK, C., COUTANT, C., DARAI, E.: Impact of serum tumor marker determination on the management of women with borderline ovarian tumors: Multivariate analysis of a French multicentre study, *European Journal of Surgical Oncology*, (2010), **36**, s. 1066–1072.
21. ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. 1. vyd. Praha: Galén, 2002. 728 s. ISBN 80-7262-201-3.
22. GADDUCCI, Angiolo, COSIO, Stefania, CARPI, Angelo, NICOLINI, Andrea, GENAZZANI, Andrea, Riccardo: Serum tumor markers in the management of ovarian, endometrial and cervical cancer, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, (2004), **58**, s. 24–38.
23. KUPKA, Karel, KUBINI, Jozef, ŠÁMAL, Martin. *Nukleární medicína*. 1. vyd. P3K, 2007. 185 s. ISBN 978-80-903584-9-2.
24. DUFFY, Michael J.: Role of tumor markers in patients with solid cancers: A critical review, *European Journal of Internal Medicine*, (2007), **18**, s. 175–184.
25. PERKINS, Greg L., SLATER, Evan D., SANDERS, Georganek, PRICHARD, John G.: Serum Tumor Markers, *American Family Physician*, 2003, **6**, s. 1075–1082.
26. <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2009/1-09/abstrakta/KBM09-TM-dopor.pdf> [cit. 2012-04-06]
27. RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie*. 1. vyd. Praha: Galén, 1999. 317 s. ISBN 80-7262-023-1.
28. HUHTINEN, K, SUVITIE, P, HIISSA, J, JUNNILA, J, HUVILA, J, KUJARI, H, SETÄLÄ, M, HÄRKKI, P, JALKANEN, J, FRASER, J, MÄKINEN, J, AURANEN, A, POUTANEN, M, PERHEENTUPA, A.: Serum HE4 concentration differentiates malignant ovarian tumours from ovarian endometriotic cysts, *British Journal of Cancer*, (2009), **100**, s. 1315–1319.
29. MOORE, Richard G. MILLER, Michael, Craig, STEINHOFF, Margaret M., SKATES, Steven J., LU, KKaren H., LAMBERT – MESSERLIAN, Geralyn, BAST JR, Robert C.: Serum HE4 levels are less frequently elevated than CA125 in women with benign gynecologic disorders, *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, (2012), **206**, s. 351.e1–8.
30. <http://oldweb.lfp.cuni.cz/journals/imj/1998/1/> [cit. 2012-15-6]

31. GADDUCCI, Angiolo, TANA, Roberta, COSIO, Stefania, GENAZZANI, Andrea, Riccardo: The serum assay of tumour markers in the prognostic evaluation, treatment monitoring and follow-up of patients with cervical cancer: A review of the literature, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, (2008), **66**, s. 10–20.
32. AGGARWAL, Pakhee, KEHOE, Sean: Serum tumour markers in gynaecological cancers, *Maturitas*, (2010), **67**, s. 46–53.
33. SIKARIS, Kenneth A.: CA125–A Test with a Change of Heart, *Heart, Lung and Circulation*, (2011), **20**, s. 634–640.
34. NOSSOV, Vladimir, AMNEUS, Malaika, SU, Feng, LANG, Jennifer, JANCO, Jo Marie Tran, REDDY, Srinivasa T., FARIAS-EISNER, Robin: The early detection of ovarian cancer: from traditional methods to proteomics. Can we really do better than serum CA125?, *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, (2008), s. 215–223.
35. SHERMAN, Morris: The resurrection of alphafetoprotein, *Journal of hepatology*, (2010), **52**, s. 939–940.
36. ALATAŞ, F., ATALAŞ, Ö., METINTAŞ, M., ÇOLAK, Ö, HARMANCI, E., DEMIR, S.: Diagnostic value of CEA, CA 15-3, CA 19-9, CYFRA 21-1, NSE and TSA assay in pleural effusions, *Lung Cancer*, (2001), **31**, s. 9–16.
37. CEDRÉS, Susana, NUNEZ, Isaac, LONGO, Marina, MARTINEZ, Pablo, CHECA, Eva, TORREJÓN, Davis, FELIP, Enriqueta: Serum Tumor Markers CEA, CYFRA 21-1, and CA125 Are Associated With Worse Prognosis In Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer (NSCLC), *Clinical Lung Cancer*, (2011), **12**, s. 172–179.
38. DUFFY, Michael J.: Carcinoembryonic Antigen as a Marker for Colorectal Cancer: Is It Clinically Useful?, *Clinical Chemistry*, (2001), **47**, s. 624–630.
39. MARRELLI, Daniele, PINTO, Enrico, DE STEFANO, Alfonso, FARNETANI, Maurizio, GAROSI, Lorenzo, ROVIELLO, Franco: Clinical utility of CEA, CA 19-9, and CA 72-4 in the follow-up of patients with resectable gastric cancer, *The American Journal of Surgery*, (2001), **181**, s. 16–19.
40. DUFFY, Michael J.: Serum Tumor Markers in Breast Cancer: Are They of Clinical Value?, *Clinical Chemistry*, (2006), **52**, s. 345–351.

41. BEREK, Jonathan, S., BAST, Robert, C.: The Use of Serial Complementary Tumor Markers To Improve Sensitivity and Specificity for Early Detection, *CANCER Supplement*, (1995), **76**, s. 2092–2096.
42. MOORE, Richard G., BROWN, Amy K., MILLER, Craig M., SKATES, Steven, ALLARD, Jeffrey W., VERCH, Thorsten, STEINHOFF, Margaret, MESSERLIAN, GERALYN, DiSILVESTRO, Paul, GRANAI, C.O., BAST JR, Robert C.: The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass, *Gynecologic Oncology*, (2008), **108**, s. 402–408.
43. MOORE, Richard G., BROWN, Amy K., MILLER, Craig M., BADGWELL, Donna, LU, Zhen, ALLARD, Jeffrey W., GRANAI, C.O., BAST JR, Robert C., LU, Karen: Utility of a novel serum tumor biomarker HE4 in patients with endometrioid adenocarcinoma of the uterus, *Gynecologic Oncology*, (2008), **110**, s. 196–201.
44. web2.stapro.cz/bullfons/22010/varia1.pdf [cit. 2012-20-06]
45. www.mou.cz/file.html?id=808 [cit. 2012-14-06]
46. GADDUCCI, Angiolo, COSIO, Stefania, GENAZZANI, Andrea, Riccardo: Tissue and serum biomarkers as prognostic variables in endometritid-type endometrial cancer, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, (2011), **80**, s. 181–192.
47. ANDERSEN, Robyn M., GOFF, Barbara A., LOWE, Kimberly A., SHCOLLER, Nathalie, BERGAN, Lindsay, DRESCHER, Charles W., PALEY, Pamela, URBAN, Nicole: Use of a Symptom Index, CA125, and HE4 to predict ovarian cancer, *Gynecologic Oncology*, (2010), **116**, s. 378–383.
48. HELLSTROM, Ingegerd, HEAGERTY, Patrick J., SWISHER, Elizabeth M., LIU, Pu, JAFFAR, Jade, AGNEW, Kathy, HELLSTROM, Karl Erik: Detection of the HE4 protein in urine as a biomarker for ovarian neoplasms, *Cancer Letters*, (2010), **296**, s. 43–48.
49. DRAPKIN, Ronny, HENNING VON HORSTEN, Hans, LIN, Yafang, MOK, Samuel C., CRUM, Christopher P., WELCH, William R., HECHT, Jonathan L.: Human Epididymis Protein 4 (HE4) Is a Secreted Glycoprotein that Is Overexpressed by Serous and Endometrioid Ovarian Carcinomas, *Cancer Research*, (2005), **65**, s. 2162–2169.

50. WANG, ShuQi, ZHAO, Xiaohu, KHIMJI, Imran, AKBAS, Ragip, QIU, Weiliang, EDWARDS, Dale, CRAMER, Daniel W., YE, Bin, DEMIRCI, Utkan: Integration of cell phone imaging with microchip ELISA to detect ovarian cancer HE4 biomarker in urine at the point-of-care, *Lab on a Chip*, (2011), **11**, s. 3371–3566.
51. WANG, Guangjie, JIN, Feng, DAI, Nan, ZHONG, Zhaoyang, QING, Yi, LI, Mengxia, YUAN, Ruo, WANG, Dong: Signal-enhanced electrochemiluminescence immunosensor based on synergistic catalysis of nicotinamide adenine dinucleotide hydride and silver nanoparticles, *Analytical Biochemistry*, (2012), **422**, s. 7–13.
52. WANG, Shoumei, GE, Lei, XIANRANG, Song, YU, Jinghua, GE, Shenguang, HUANG, Jiadong, ZENG, Fang: Paper-based chemiluminescence ELISA: Lab-on-paper based on chitosan modified paper device and wax-screen-printing, *Biosensors and Bioelectronics*, (2012), **31**, s. 212–218.
53. HOLCOMB, Kevin, VUCETIC, Zivjena, MILLER, Craig, KNAPP, Robert C.: Human epididymis protein 4 offers superior specificity in the differentiation of benign and malignant adnexal masses in premenopausal women, *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, (2011), **205**, 358.e1–6.
54. <http://www.screenoncancer.com/download/Cancer%20Prevention%20and%20Early%20Detection%20with%20Biomarkers%20C-12.pdf> [cit. 2012-15-06]
55. JACOB, Francis, MEIER, Mara, CADUFF, Rosmarie, GOLSTEIN, Darlene, POCHECHUEVA, Tatiana, HACKER, Neville, FINK, Daniel, HEINZELMANN-SCHWARZ, Viola: No benefit from combining HE4 a CA125 as ovarian tumor markers in a clinical setting, *Gynecologic Oncology*, (2011), **121**, s. 487–491.
56. CHRISTENSON, Robert, H., CERVELLI, Denise, R., STERNER, Jamie, BACHMANN, Lauren M., REBUCK, Heather, GRAY, Jeffery, KELLEY, Walter E.: Analytical performance and clinical concordance of the cancer biomarkers CA 15-3, CA 19-9, CA125 II, Carcinoembryonic Antigen, and Alpha-Fetoprotein on the Dimension Vista® System, *Clinical Biochemistry*, (2011), **44**, s. 1128–1136.
57. MOORE, Richard G., McMEEKIN, D. Scott, BROWN, Amy K., DiSILVESTRO, Paul, MILLER, CRAIG M., ALLARD, Jeffrey W., GAJEWSKI, Walter, KURMAN, Robert, BAST JR, Robert C., SKATES, Steven J.: A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass, *Gynecologic Oncology*, (2009), **112**, s. 40–46.