

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO - TECHNOLOGICKÁ

Katedra biologických a biochemických věd

Role pepsinogenů A/C při karcinomu žaludku

Bakalářská práce

Veronika Sedláková

2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Veronika Sedláková**
Osobní číslo: **C09593**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Role pepsinogenů A/C při karcinomu žaludku**
Zadávací 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 :

1. Vypracujte teoretickou rešerši zabývající se pepsinogeny A a C. Zaměřte se na charakterizaci těchto látek, jejich fyziologickou funkci v organismu a dále pak na to jakou roli hrají při karcinomu žaludku popř. jiných onemocněních.
2. Uveďte jaké techniky se používají ke stanovení těchto látek, jaký materiál se pro tato stanovení využívá, jaké jsou intervaly fyziologických hodnot a jaké je diagnostické využití. Zmiňte také význam stanovení poměru hladin obou pepsinogenů.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **ca 30 stran**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Barbora Jankovičová

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 2011

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 Týnci nad Sázavou dne 10. 7. 2012

Veronika Sedláková

PODĚKOVÁNÍ

Tímto chci poděkovat Mgr. Barboře Jankovičové Ph.D., vedoucí mé bakalářské práce za cenné rady, poskytnuté materiály, připomínky a podporu při zpracování daného tématu.

ANOTACE

Práce je zaměřena ve své úvodní části na základní anatomické dělení žaludku a zde probíhající fyziologické mechanismy.

Dále se zabývá karcinomem žaludku, konkrétně jeho epidemiologií, klinickými příznaky, příčinami, diagnostikou a léčbou. Blíže popsány jsou také důležité biomarkery tohoto onemocnění, a to pepsinogeny A a C. Zmíněna je jejich fyziologická funkce, klinický význam a diagnostické využití při onemocněních gastrointestinálního traktu. V neposlední řadě se práce zabývá možnostmi laboratorního stanovení pepsinogenu A a C.

KLÍČOVÁ SLOVA

Žaludek, karcinom žaludku, pepsinogen A, pepsinogen

ANNOTATION

Introductory section of this bachelor thesis is focused on basic anatomical division of stomach and associated physiological mechanisms.

It also deals with gastric cancer, especially its epidemiology, clinical symptoms, causes, diagnosis and treatment. Important biomarkers of this disease, pepsinogen A and C, are described in more detail. Their physiological function, clinical significance and diagnostic application in diseases of the gastrointestinal tract are mentioned. Finally, the thesis discusses possibilities of pepsinogen A and C laboratory determination.

KEYWORDS

Stomach, gastric cancer, pepsinogen A, pepsinogen C

Obsah

Seznam zkratk.....	9
1 Žaludek.....	12
1.1 Anatomie.....	12
1.1.1 Stavba stěny žaludku	13
1.1.2 Cévní a nervové zásobení	15
1.2 Fyziologie	16
1.2.1 Žaludek	16
2 Karcinom žaludku.....	18
2.1 Rizikové faktory	21
2.2 Klinické příznaky.....	22
2.3 Klasifikace karcinomu	22
2.4 Diagnostika	24
2.4.1 Anamnéza	25
2.4.2 Fyzikální vyšetření	25
2.4.3 Laboratorní vyšetření.....	25
2.4.4 Rentgenové vyšetření	28
2.4.5 Endoskopie	29
2.4.6 Sonografie.....	29
2.4.7 PET/CT.....	30
2.5 Léčba.....	30
2.5.1 Chirurgická léčba.....	30
2.5.2 Chemoterapie.....	31
2.5.3 Radioterapie.....	31
3 Pepsinogen.....	32
3.1 Pepsinogen A	33
3.2 Pepsinogen C	33
3.3 Klinický význam pepsinogenu A/C.....	34
3.4 Metody stanovení pepsinogenu A a C	35
3.4.1 RIA	36
3.4.2 EIA	36
3.4.3 Nekompetitivní ELISA.....	37
3.4.4 Kompetitivní ELISA	38
3.4.5 Skenovací elektrochemická mikroskopie	39
3.4.6 Stanovení míry fosforylace.....	40

Závěr.....	42
Seznam použité literatury	43

Seznam zkratek

AFP	α_1 -fetoprotein
AChE	acetylcholinesteráza
ALP	alkalická fosfatáza
APC	adematózní polypóza tlustého střeva
CA	karbohydrátový antigen
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CEA	karcinoembryonální antigen
CT	počítačová tomografie
Da	dalton
DAB	3,3-diaminobenzidin
DBA	3,4-diaminobenzoová kyselina
DCC	gen deletovaný při kolorektálním karcinomu
EC	enterochromafinní buňky
EIA	enzymová imunoanalýza
ELISA	enzymová imunisorbentní analýza
FcOH	ferrocenemethanol
Fc	ferrocene
GCC	guanylyl cykláza C
GICA	antigen gastrointestinálního karcinomu
GIP	gastrointestinální inhibiční peptid
GIT	gastrointestinální trakt
GOX	glukózaoxidáza
hCG	lidský choriový gonadotropin
HCl	kyselina chlorovodíková
HRP	křenová peroxidáza
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
LD	laktátdehydrogenáza
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IL-8	interleukin 8
IMAC	afinitní chromatografie s imobilizovanými kovovými ionty

kDa	kilodalton
NBI	úzké zobrazovací pásmo
NMR	nukleární magnetická rezonance
OPD	o-fenylendiamin
PET	pozitronová emisní tomografie
PG	pepsinogen
PGA, PGI	pepsinogen A popř. I
PGC, PGII	pepsinogen C popř. II
PSA	prostatický specifický antigen
RIA	radioimunoanalýza
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
RTG	rentgenové vyšetření
SCEM	skenovací elektrochemická mikroskopie
SMP	zpomalená proteáza
STM	skenovací tunelová mikroskopie
TAG 72	s tumorem asociovaný glykoprotein
Tg	thyreoglobulin
TMB	tetramethylbenzidin
UICC	výbor pro nádorovou nomenklaturu a statistiku
VIP	vasoaktivní intestinální peptid

Úvod

Karcinom žaludku je jedno z nejčastějších maligních onemocnění v České republice, což bylo důvodem, proč mě daná problematika zaujala a zvolila jsem si toto téma pro zpracování.

Práci jsem rozdělila do tří částí, které na sebe vzájemně navazují. V první části je podrobně popsána anatomie a fyziologie žaludku. Zmíněna je především stavba žaludeční stěny a funkce žaludečních žlázek v různých jeho oblastech. Tato část je důležitá hlavně pro pochopení dalších navazujících částí práce.

V druhé části se zabývám problematikou maligního onemocnění žaludku. Karcinom žaludku je časté onemocnění především starších věkových skupin. Na jeho vznik má vliv řada vnějších, ale i vnitřních faktorů. Podstatou je právě změna struktury a funkce žaludku. Abychom mohli toto maligní onemocnění lépe určit, stanovujeme různé biomarkery, které korelují se stavem žaludku. Nedílnou součástí diagnostických postupů je endoskopické vyšetření spojené s odběrem biopsií. Tyto diagnostické postupy jsou provázeny zobrazovacími metodami jako je např. PET/CT. Správná diagnostika je základem vhodně zvolené léčby a terapie, které jsou nesmírně důležitá na psychický stav nemocného.

Poslední část mé práce je věnována pepsinogenu A a pepsinogenu C, enzymově neaktivním bílkovinám, které jsou typickými biomarkery stanovovanými při onemocněních gastrointestinálního traktu. Popsány jsou jejich funkce, klinický význam a vliv na vznik karcinomu žaludku případně jiných onemocnění. Samostatná kapitola je pak věnována laboratorním metodám jako je ELISA a SECM používaným pro stanovení množství pepsinogenu A/C v séru.

Pro zpracování této problematiky jsem použila především lékařsky zaměřené odborné články v odborných časopisech, periodikách a různých zprávách z konferencí.

1 Žaludek

1.1 Anatomie

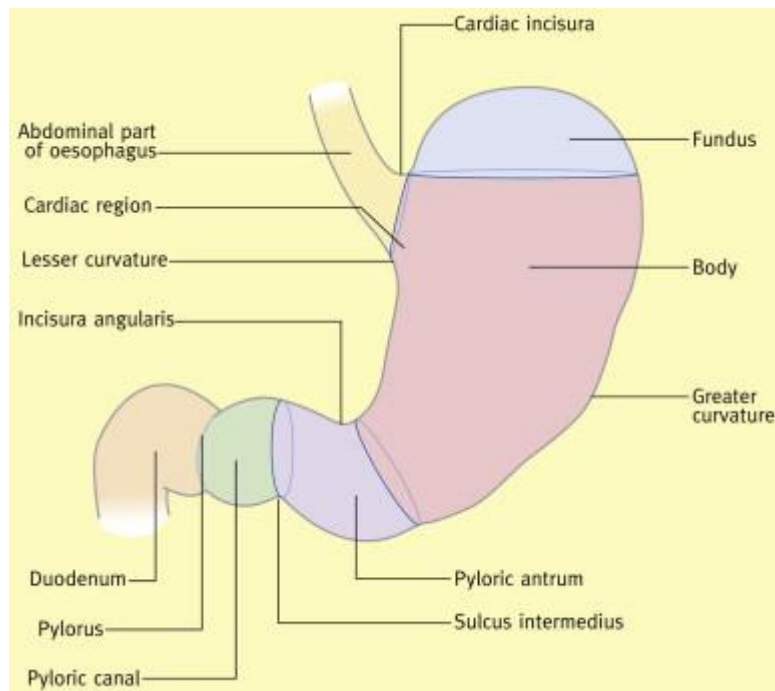
Žaludek (*ventriculus, gaster*) je svalový orgán vakovitého tvaru, který je součástí trávicí soustavy a spojuje konec jícnu a počáteční úsek střev. Funguje jako zásobník přijaté potravy, kterou předběžně mechanicky a chemicky zpracovává a po částech transportuje do tenkého střeva (*intestinum tenue*). Uložení žaludku se nachází v levé horní části dutiny břišní. Část žaludku leží pod levým lalokem jater a brániční klenbou. Žaludek můžeme rozdělit dle anatomických oblastí na [1,2]:

- Česlo (*kardia verticuli*) - je místem vstupu jícnu do žaludku při malé křivatuře (*curvatura minor*), nebo-li malém zakřivení okrajové části žaludku, obrácené konkavitou doprava a nahoru.
- Fundus (*fundus gastricus*) - nejširší horní úsek žaludku je zakončen žaludeční klenbou. Obvykle bývá naplněn bublinami vzduchu z polykané potravy.
- Tělo žaludku (*corpus gastricum*) - je největší střední část, a slouží jako rezervoár potravy.
- Pylorická část (*pars pylorica*) - je nejužší koncový úsek žaludku. Zahrnuje počáteční úsek *antrum pyloricum* přes *canalis pyloricus* až uzavíratelné části vratníku (*pylorus*) [1,3].

Dále můžeme žaludek rozlišit na přední stěnu žaludku (*paries anterior*) a zadní stěnu žaludku (*paries posterior*). Tvar a velikost žaludku se liší podle množství náplně a polohy těla. Velikost prázdného žaludku činí přibližně 25 cm a po náplni může objem dosahovat 1 - 1,5 litru [1,2]. Rozlišujeme dva základní typy tvaru žaludku:

- Hákovitý žaludek je ve tvaru písmene J, charakteristický dlouhou sestupnou částí a kratší vzestupnou částí. Tento typ žaludku se častěji vyskytuje u osob ve stoje a po naplnění žaludku potravou.
- Žaludek tvaru býčího rohu je typický svým šikmým uložením, plynulým zúžením a pozvolným zakřivením. Tento typ se častěji vyskytuje u atletických osob, osob s prázdným žaludkem a také u osob v poloze vleže [1,2].

O tvaru a poloze žaludku nám podává přesnější informace rentgenové vyšetření, NMR a CT, o kterých se budu zmiňovat v následující kapitole.



Obr. 1: Jednotlivé části žaludku (převzato z [4])

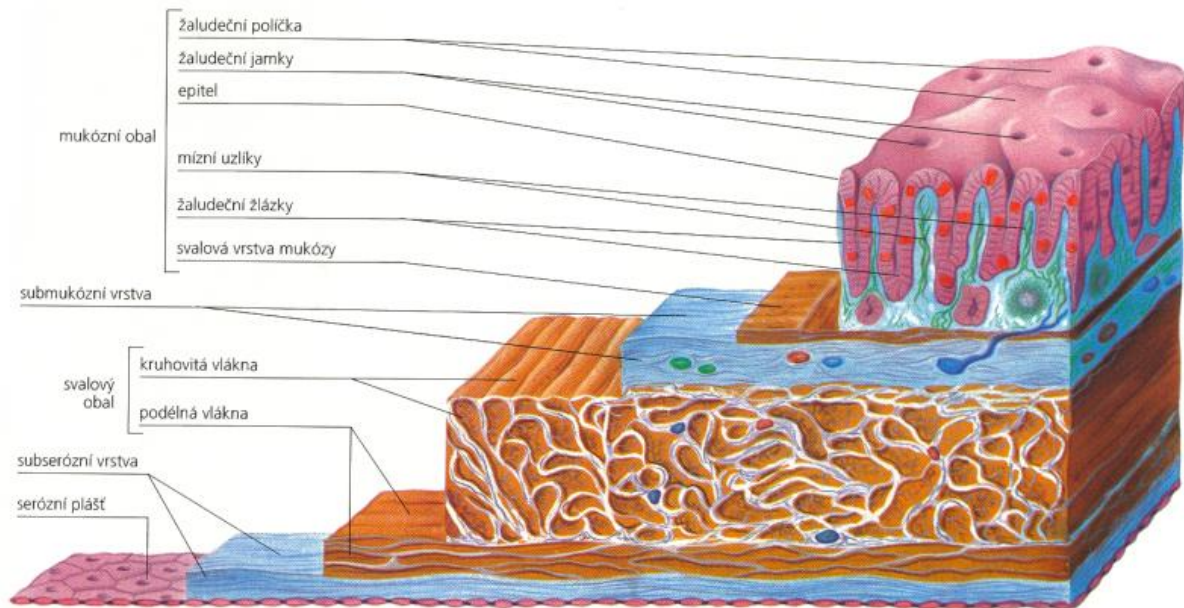
1.1.1 Stavba stěny žaludku

Žaludeční stěna se skládá ze čtyř vrstev sliznice žaludku, podslizničního vaziva, svaloviny a serózního povlaku:

- a) Sliznice žaludku (*tunica mucosa*) je složena z podélné řasy růžové až načervenalé barvy. Povrch sliznice kryje jednovrstevný cylindrický epitel, ve kterém jsou vytvořeny žaludeční jamky (*foveolae gastricae*). Na dně jamek vyúsťují žaludeční žlázy, které můžeme rozdělit podle místa vzniku v žaludku a jejich funkce [1,2]:
 - Žlázy vznikající v oblasti kardií (*glandulae cardiacae*) se vyskytují na kardií v prstenčitém okrsku. Tyto žlázy jsou rozvětvené tubulózně. Jejich hlavní funkcí je tvořit ochranný hlen či povlak sliznice.
 - Žlázy vznikající v oblasti fundu a těla žaludku (*glandulae gastricae propriae*). Tvoří dlouhé tubulózní mírně rozvětvené žlázy. Obsahují řadu buněk, které mají významnou funkci. Mezi tyto buňky se řadí: hlavní buňky produkující pepsinogen a lipázu, krycí buňky (parietální) odpovědné za tvorbu HCl a vnitřního faktoru, hlenové buňky krčků produkující hlen bohatý na glykosaminoglykany a lysozym, hlenové buňky isthmů produkující neutrální hlen, nediferencované buňky schopné diferenciace v jakýkoliv jiný epitel

žaludeční výstelky a endokrinní buňky (G, D, EC a jiné) vylučující hormony do krve. G-buňky produkují hormon gastrin, který zvyšuje sekreci žaludeční šťávy, tvorbu HCl a pepsinu. D-buňky produkují hormon somatostatin, který je inhibítozem sekrece žaludeční šťávy. EC-buňky produkují hormon serotonin, jenž má hlavní úlohu řízení motility.

- Žlázy vznikající v pylorické oblasti (*glandulae pyloricae*) se vyskytují v pylorické části žaludku. Mají podobné složení jako žlázy hlenové, které obsahují velké množství enzymu lysozymu. Ale také obsahují endokrinní buňky typu G produkující hormon gastrin [1,3].
- b) Podslizniční vazivo (*tela submucosa*) připojuje sliznici ke svalovině. Jedná se o velmi silnou vrstvu řídkého kolagenního vaziva s elastickými vlákny. Tato vrstva obsahuje krevní a mízní cévy a nervové pleteně. Hlavní funkcí podslizničního vaziva je posouvání sliznice při změně náplně žaludku [2].
- c) Svalovina žaludku (*tunica muscularis*) je složena ze tří vrstev:
- zevní (podélná, *stratum longitudinale*) - je zesílena v obou částech kurvatur.
 - střední (cirkulární, *stratum circulare*) - nejmohutnější svalovina v oblasti pyrolu, který tvoří vrátníkový svěrač (*musculus sphincter pyloricus*)
 - vnitřní (šikmá, *fibrae oblique*) - přiléhá zejména v kardii a částečně i ve fundu. Snopce, které vedou šikmo k velké křivatuře (*curvatura major*). Velké zakřivení žaludku směřující konvexitou nalevo dolů.
- d) Poslední částí stěny žaludku je serózní povlak neboli pobřišnice (*peritoneum*). Je to hladká, tenká vazivová blanka, která obaluje žaludek. Je srostlá s vrstvou svaloviny, přechází z velké a malé kurvatury do velké a malé předstěry (*omentum minus a omentum major*) [1,2].



Obr. 2: Žaludeční stěna (převzato z [5])

1.1.2 Cévní a nervové zásobení

Tepny žaludku se dělí na tři hlavní tepny žaludeční, jaterní a slezinná (*arteria gastrica sinistra*, *arteria hepatica communis* a *arteria splenica*), které jsou vedeny z břišní aorty. Ty pak obklopují malou a velkou křivaturu. V oblasti malé křivatury často dochází ke vzniku vředů, z nedostatečného prokrvení. Proto je důležitá žaludeční mikrocirkulace.

Žíly žaludku následují tepny v obou křivaturách. Pravá a levá žaludeční žíla (*vena gastrica dextra et sinistra*) na malé křivatuře a pravá, levá žíla předstěry žaludku (*vena gastroomentalis dextra et sinistra*) na velké křivatuře, které vyúsťují do vrátnicové žíly (*vena portae*). Společně tvoří cévní pleteně, které se vyskytují ve stěně žaludku, konkrétně se jedná o vrstvu submukózní, svalovou a subserózní.

Inervaci žaludku zajišťuje parasymptická a symptická nervová vlákna. Hlavním parasymptickým nervem je bloudivý nerv (*nervus vagus*), který se účastní motorických a sekrečních funkcí. Symptická a parasymptická vlákna vytvářejí ve stěně žaludku, přímo v podslizničním vazivu pleteně. Sympatikus pracuje opačně než parasymptikus a slouží především k ochraně žaludeční sliznice [1,3].

1.2 Fyziologie

Potrava přijatá ze zevního prostředí obsahuje anorganické i organické látky, které jsou důležité pro udržení životních funkcí. Trávicí systém má tyto hlavní funkce: trávení (mechanické a chemické zpracování potravy), vstřebávání (přestup látek do krve), přeměna, skladování a vylučování živin [6].

1.2.1 Žaludek

V žaludku dochází ke skladování, mechanickému a chemickému zpracování potravy, která se sem dostává z jícnu. Přijatá potrava se po částech ukládá v těle žaludku (*corpus gastricum*). Přibližně po hodině klidu se zvyšuje tonus a začíná žaludeční peristaltika. Vznik depolarizačních vln vyvolá peristaltické stahy, které rozměňují a posouvají propulzí potravu směrem k pyloru, kde dojde k drcení potravy [6]. Retropulzí je obsah potravy dokonale promíchán s žaludeční šťávou. Vzniklá trávenina neboli chymus je dále po částech posouvána do tenkého střeva. Žaludeční peristaltika je řízena humorálně [7]. Zvýšení motility žaludku způsobuje hormon gastrin a naopak snížení ovlivňují somatostatin, VIP, GIP a sekretin.

Denně se vytvoří 2 - 3 litry žaludeční šťávy, která ovlivňuje pH žaludku. Je tvořena žaludečními žlázkami ze sliznice žaludku. Sliznice je pokryta cylindrickým epitelem produkujícím hlen mucin, který chrání sliznici žaludku. Žaludeční žlásky obsahují parietální buňky a hlavní buňky, které jsou uloženy v horní třetině oblasti žaludku. Parietální buňky produkují HCl a vnitřní faktor (*intrinsic factor*), který je potřebný pro vstřebávání vitamínu B₁₂ v terminálním ileu. Po příjmu potravy se zvyšuje sekrece HCl z parietálních buněk. HCl má antibakteriální účinky, brání rozkladu některých vitamínů B₁, B₂, C a usnadňuje rozklad bílkovin tím, že způsobuje bobtnání vaziva a následné rozvolnění svaloviny na jednotlivá vlákna. Dále udržuje žaludek v kyselém prostředí a umožňuje vstřebávání železa a vápníku ve střevě [6,7,8,9].

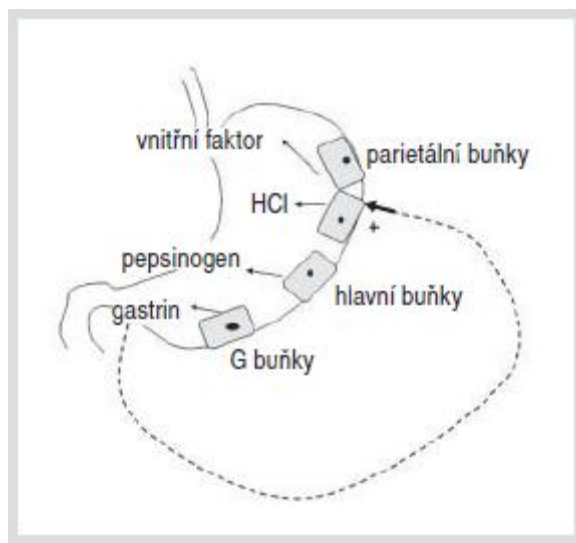
Hlavní buňky vylučují neaktivní pepsinogen, který se přemění v kyselém prostředí na aktivní pepsin. Na jeho aktivaci má velký vliv právě produkce HCl. Pepsin (proteáza) zahajuje štěpení bílkovin na polypeptidy. Sekreci pepsinogenu ovlivňuje neurotransmitter acetylcholin, histamin a hormon gastrin:

- Gastrin - je produkovaný v G-buňkách antru žaludku, v duodenu, δ -buňkách pankreatu, stimuluje žaludeční sekreci a motilitu žaludku v závislosti na přijaté potravě.
- Acetylcholin - neurotransmitter, aktivuje sekreci HCl.
- Histamin - stimuluje sekreci HCl, působením histaminu na H_2 receptory parietálních buněk, které aktivují adenylcyklázu. Zvýší se tak hladina cAMP, který stimuluje proteinkinázu fosforylující protein regulující sekreci HCl [7].

Žaludeční sekrece je řízena humorálně a nervově - bloudivým nervem (*nervus vagus*). Dělí se na 3 fáze:

1. Nervová fáze - je řízena na základě podmíněných (zrakové podněty, myšlení na jídlo) a nepodmíněných reflexů (chuťové a čichové podněty).
2. Žaludeční fáze - působení mechanoreceptorů a chemoreceptorů na žaludeční sliznici. Tyto receptory ovlivňují sekreci hormonu gastrinu.
3. Intestinální fáze - řízená humorálně hormonem sekretinem, cholecystokininem a neurotransmiterem histaminem:
 - Sekretin - uvolňuje se působením kyselého chymu do duodena a zvyšuje obsah vody a bikarbonátu.
 - Histamin - uvolňuje se z žirných buněk sliznice žaludku a difuzí se dostává k parietálním buňkám. Nejdůležitější stimuluje H^+ , o kterém byla již zmínka v předešlém odstavci.
 - Cholecystokinin - uvolňuje se z duodena a působí na trávení bílkovin a tuků, stimuluje sekreci enzymů z pankreatu a vyprazdňování žlučníku a žaludku [6,7,8,9].

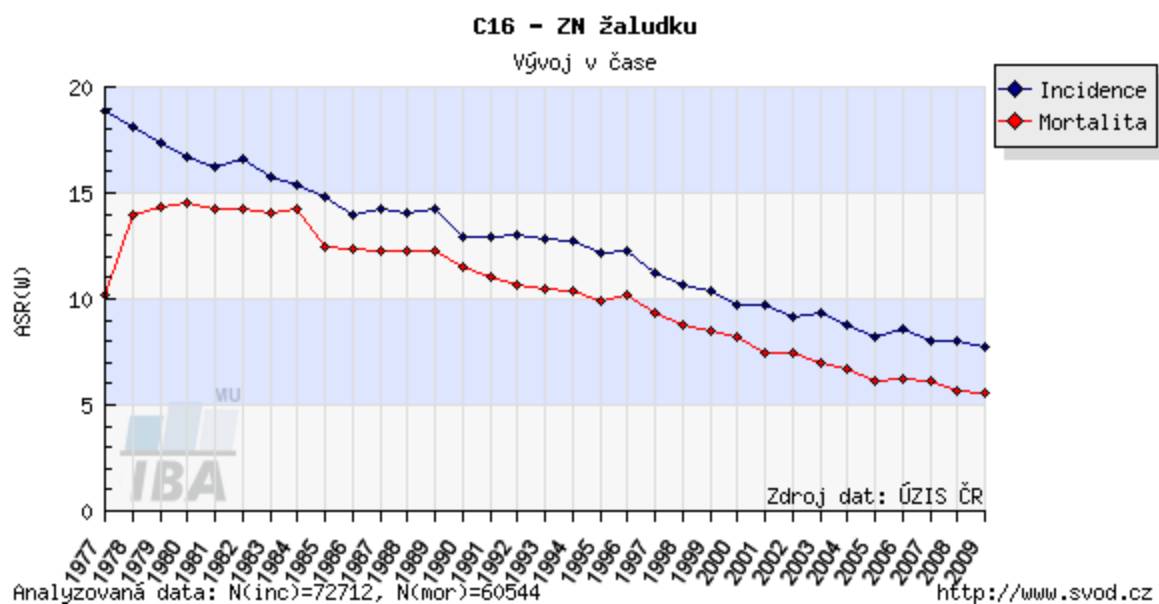
Ke konečnému trávení a vstřebávání potravy pak dochází v tenkém střevě, nejvíce v duodenu. Přijatá potrava ze žaludku se zde rozkládá na nejjednodušší látky, které jsou transportovány do krve a lymfy.



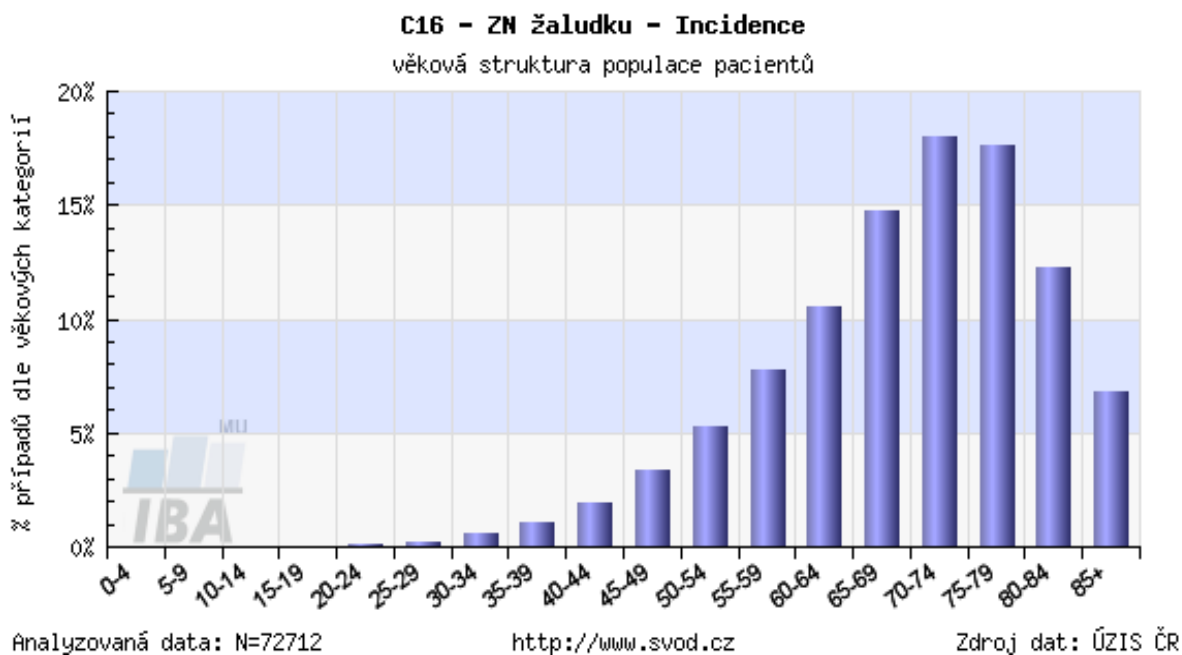
Obr. 3 - Buňky žaludeční sliznice (převzato z [9])

2 Karcinom žaludku

Karcinom žaludku představuje po karcinomu plic druhé nejčastější maligní onemocnění v celosvětovém měřítku. Přestože incidence tohoto typu karcinomu klesá, úmrtnost onemocnění je dosti vysoká (viz Obr. 4). V Tab. 1 je možné vidět, že největší výskyt onemocnění karcinomem žaludku je zaznamenán v asijských zemích. Na pokles incidence má zejména vliv změna životního stylu včetně jídelníčku. Nejvyšší mortalita zhoubného nádoru je pozorována ve starším věku populace, což můžeme vidět na Obr. 5 a také je mnohem vyšší u mužů než u žen. Největší zastoupení klinických stádií je asi 43 % neznámé stádium, 28 % IV. stádium, 12 % III. stádium, 10 % II. a 8 % I. stádium. Dle těchto údajů je zřetelné, že onemocnění je diagnostikováno zejména v pokročilém stádiu.



Obr. 4 - Časový vývoj incidence a mortality zhoubných nádorů žaludku v ČR (převzato z [10])



Obr. 5 - Věková struktura populace pacientů a zemřelých na zhoubné nádory žaludku (převzato z [10])

Tab. 1 - Srovnání incidence a mortality ve světě, přepočet na 100 000 osob (převzato z [10])

Země	incidence	mortalita
Japonsko	80,2	39,4
Jižní Korea	56,3	21,2
Bělorusko	36,4	31
Čína	34,5	26,2
Rusko	28,7	25,5
Ekvádor	22,4	20
Německo	18,6	12,9
Slovensko	17,2	12,9
Česká republika	15,1	11,5
Řecko	13,3	12
Brazílie	10,7	8,8
Austrálie	9,3	5,6
Mexiko	7,2	6,2
Spojené státy americké	6,9	3,5
Pákistán	4	3,7
Jihoafrická republika	2,2	2,1
Botswana	0,2	0,2

Žaludeční karcinom se vyvíjí se složitým mnohastupňovým procesem s několika zřetelnými histologickými a patofyziologickými fázemi. Celý vývoj je ovlivňován komplexem interakcí mezi bakteriemi, prostředím, genetickými dispozicemi hostitele a molekulárnímu mechanismy. Závažné maligní onemocnění postihuje především žaludeční stěnu a regionální uzliny. Postupně metastázuje do dutiny břišní a do ostatních orgánů. Onemocnění bývá často diagnostikováno v pokročilém stádiu s přítomností metastází pronikajících do lymfatického systému [11].

Žaludeční karcinom tvoří z 90 – 95 % adenokarcinomy, vycházející z žaludeční mukózy, 4 % jsou lymfomy, 3 % hormonálně aktivní tumory a 2 % buňky ze žaludeční stěny [19].

2.1 Rizikové faktory

Vznik karcinomu žaludku není přesně objasněn. Na jeho vznik má ale vliv celá řada vnějších i vnitřních rizikových faktorů např. [9,12,13,14,15,47]:

- Strava - obsahující karcinogeny (aflatoxin, nitráty a nitrity), nedostatečná konzumace ovoce a zeleniny (nedostatek vitamínu A, C a vlákniny), nadměrné množství alkoholu, soli, cukru a tuku.
- Kouření - účinky kouření způsobují řadu patologických změn a to i u lidí pouze se vyskytujících v zakouřeném prostředí. Zplodiny kouře mají karcinogenní vliv zejména na vznik rakoviny plic, koronární aterosklerózy, ale také na rozvoj atrofické gastritidy a intestinální metaplazie.
- Pracovní prostředí - zejména výskyt radioaktivity a ionizujícího záření. Ionizující záření je děj, při kterém dochází k uvolnění elektronů z vyšší energetické hladiny na nižší energetickou hladinu. Radioaktivita je samovolný rozpad jader atomů na menší jádra, při kterém je do okolí emitováno radioaktivní záření a to ve formě elektromagnetického záření.
- Genetické vlivy - konkrétní mutace v genetické výbavě spojována s karcinomem žaludku není přesně zjištěna, ale existují určité typy mutací, které se vyskytují u tohoto typu onemocnění ve vyšší míře např. mutace genu p53 (chromozom 17p) byla nalezena u 60 % pacientů, mutace genu APC (chromozom 5q) byla nalezena u 60 % a mutace genu DCC (chromozom 18q). Některé formy karcinomů jsou tak dědičné, u jiných je jen 2-3 krát zvýšená pravděpodobnost rozvoje rakoviny u příbuzných nemocného, který už tuto rakovinu má. Karcinom žaludku se dále často vyskytuje u Lynchova syndromu.
- Infekce *Helicobacter pylori* - *Helicobacter pylori* byl označen Světovou organizací International Agency for Research on Cancer v roce 1994 za karcinogen I. třídy. Jde o spirálovitou gramnegativní bakterii, která je schopna žít v kyselém prostředí a kolonizuje sliznici žaludku. Působí v žaludku chronický zánět (gastritidu), jenž úzce souvisí se žaludečními (peptickými) vředy. Snižuje sekreci HCl v žaludku. Způsobuje helicobacterovou gastritidu a může vést ke vzniku atrofické gastritidy s intestinální metaplazií. Přítomnost *Helicobacter pylori* souvisí také se vznikem karcinomu žaludku. V patogenezi onemocnění se uplatňuje různé faktory virulence této bakterie, které mohou způsobit morfologickou proměnu

epiteli žaludku a indukovat produkci prozánětlivých modulátorů. Pokud infekce trvá od dětství riziko vzniku karcinomu se zvyšuje.

- Stres, věk, aj.

2.2 Klinické příznaky

Karcinom žaludku je nebezpečný především tím, že se na něj většinou přichází pozdě, neboť nepůsobí nějaké výraznější typické obtíže. Klinické příznaky karcinomu žaludku v časném stádiu jsou dosti nespecifické až negativní a často nepřivedou pacienta k lékaři nebo je v některých případech podcení dokonce sám lékař. Jeho přechod pozdní formu může trvat i řasu let. Bohužel až potom se objevují opravdové obtíže, které pacienta nutí hledat lékaře [15].

V průběhu nemoci se mohou objevit příznaky jako je nauzea, nepříjemné bolesti břicha, zvýšená tělní teplota, slabost, únava. V dalším průběhu nemoci mohou nastat další příznaky jako pálení žáhy, úbytek na váze (anorexie), únava, dysfagie (potíže s polykáním) a okultní krvácení. Tyto příznaky se mohou objevit i při jiných nenádorových (např. žaludeční vředy) či závažných onemocněních, které je potřeba od sebe včas rozlišit [12,16].

2.3 Klasifikace karcinomu

Výbor pro nádorovou nomenklaturu a statistiku (UICC) ustanovil obecná pravidla klasifikace rozsahu zhoubných nádorů a jejich stádií. Pro rozvoj klasifikačního systému je nutné spolupracovat v nejužším měřítku v rámci mezinárodních i národních výborů. 7. vydání Klasifikace zhoubných nádorů vyšlo v české verzi v roce 2011 [17].

Tzv. TNM klasifikace nádorů žaludku (viz Tab.2) poskytuje informace o rozsahu tumoru, umožňuje rozdělení do jednotlivých stádií (tzv. staging) viz Tab. 2, 3, hodnotí léčebné výsledky pro volbu terapeutické léčby a usnadňuje výměnu informací mezi různými léčebnými centry. Označení TNM znamená: T (tumor) hodnotí rozsah primárního nádoru, N (lymfatické uzliny) - vyjadřuje přítomnost či nepřítomnost metastáz v regionálních mízních uzlinách, M (metastáza) - vyjadřuje přítomnost či nepřítomnost vzdálených metastáz. Dále rozlišujeme dva typy klasifikace [17]:

- klinická klasifikace (cTNM) - získané nálezy před léčbou.
- patologická klasifikace (pTNM) - získané nálezy při chirurgickém zákroku.

Podle histologicko-epidemiologického hlediska dělíme nádory na dva základní typy, tj.- klasifikace podle Lauréna [12,14,18]:

- Intestinální typ - vzniká intestinální metaplasíí nebo v souvislosti s výskytem *Helicobacter pylori*. Je charakteristický žlázovou strukturou a šíří se do hlubší vrstvy stěny. Nachází se u osob staršího věku.
- Difúzní typ - se skládá z malých buněk, které se šíří diskontinuálně. Většinou se nachází u osob mladšího věku a vyšší pravděpodobnost výskytu je u osob s krevní skupinou A.

Tab. 2 - TNM klinická klasifikace nádorů žaludku (převzato z [11])

T - primární nádor	
TX	Primární nádor nelze hodnotit
T0	Bez známek primárního nádoru
Tis	Karcinom <i>in situ</i>
T1	Postižení <i>lamina propria</i> nebo submukózy
T2	Postižení <i>muscularis propria</i> nebo subserózy
T3	Nádor proniká na serózu, bez invaze do okolních struktur
T4	Nádor se šíří do okolních struktur
N - regionální mízní uzliny	
NX	Regionální mízní uzliny nelze hodnotit
N0	V regionálních mízních uzlinách nejsou metastázy
N1	Metastázy v 1 až 6 regionálních mízních uzlinách
N2	Metastázy v 7 až 15 regionálních mízních uzlinách
N3	Metastázy ve více než 15 regionálních mízních uzlinách
M - vzdálené metastázy	
MX	Vzdálené metastázy nelze hodnotit
M0	Nejsou vzdálené metastázy
M1	Vzdálené metastázy jsou přítomny

Tab. 3 - Stádia karcinomu žaludku - tzv. staging (převzato z [18])

Stádia	TNM
0	Tis, N0, M0
IA	T1, N0, M0
IB	T1, N1, M0
	T2, N0, M0
II	T1, N2, M0
	T2, N1, M0
	T3, N0, M0
IIIA	T2, N2, M0
	T3, N1, M0
IIIB	T4, N0, M0
IV	T4, N2, M0
	Jakékoliv T, N M1

2.4 Diagnostika

Při podezření na karcinom žaludku se provádí jako první základní vyšetření anamnéza, fyzikální vyšetření a laboratorní vyšetření krve. Podle odchylky ve výsledcích, lékař určí další specifické vyšetření. Jako první specifické vyšetření se většinou provádí endoskopie s odběrem biopsie pro histologické vyšetření. Senzitivita tohoto vyšetření je 95 % s autofluorescencí se pak zvyšuje zvláště u časných nádorových onemocnění [11,19]. Technika endoskopie se neustále zlepšuje, setkat se můžeme např. s chromoendoskopií (používající vitálních barviv tj. metylénová modř, nebo metodami zvětšování obrazu a rozlišovací schopnosti obrazu (NBI). Endoskopie v kombinaci s NBI umožní detailní posouzení povrchu sliznice. Další metody jako je autofluorescenční endoskopie a koherentní tomografie čeká další klinické testování [20].

Pokud je pravděpodobnost přítomnosti karcinomu žaludku, je potřeba provést tzv. staging technikami jako je např. PET/CT. Tyto zobrazovací metody mohou ukázat vzdálené metastázy a zvětšení uzlin v okolí žaludku. Pokud je včasné karcinom diagnostikován je zde naděje na úplné uzdravení [19].

2.4.1 Anamnéza

Anamnéza představuje základní vyšetření pro další diagnostické postupy. Charakteristickým rysem anamnézy je objasnit vznik nemoci, určit příčiny vzniku a příznaků nemoci. Probíhá na základě rozhovoru lékaře s pacientem. Lékař klade cílené otázky na pacientův zdravotní stav. Snaha lékaře je vystihnout, co nejpřesněji podstatné obtíže pacienta. Anamnézu můžeme rozdělit do 4 částí. První část anamnézy se označuje nynější. Lékař se táže na aktuální stav nemocného. Následuje osobní anamnéza, která nás informuje o stavu pacienta během života. Otázky jsou kladené na požívání alkoholu, omamných a psychotropních látek či kouření. Dále se nesmí opomenout záznam o užívání léků a následných alergických reakcí. Pracovní a sociální anamnéza charakterizuje, v jakém prostředí pacient žije. A poslední částí je rodinná anamnéza, jenž nám poskytuje informace o blízké rodině pacienta. Tato část je velmi důležitá a neměla by se zanedbávat, může odhalit pacientův genetický předpoklad ke vzniku daného onemocnění [21].

2.4.2 Fyzikální vyšetření

Objektivní vyšetření provádí lékař na základě jeho smyslů, a to pohledem (aspekce), pohmatem (palpace), poklepem (perkuze) a poslechem (auskultace). Takto by měl lékař u každého pacienta, alespoň orientačně a systematicky vyšetřit jednotlivé orgánové systémy a zaznamenat tak pozorované příznaky. Dále se hodnotí celkový vzhled pacienta, tělesná hmotnost, teplota a krevní tlak [22].

2.4.3 Laboratorní vyšetření

Laboratorní vyšetření se řadí mezi základní metody používané při diagnostice nejruznějších onemocnění. Cílem těchto stanovení bývají specifické biomarkery spojované s daným typem onemocnění.

Při podezření na maligní tumor u pacienta vyšetření tumorových markerů. Stanovení hladiny těchto markerů slouží nejen pro stanovení diagnózy, ale také pro prognózu a kontrolu průběhu léčby onemocnění [23]. Tzv. nádorové markery (tumor

markers) jsou laboratorně prokazatelné makromolekulární látky, které se mohou vyskytovat v séru, ale i jiných tělních tekutinách v souvislosti s nádorovými onemocněními. Jedná se o různorodé látky většinou bílkovinné povahy, jejich přítomnost svědčí o vzniku maligního procesu a poskytují nám informace o vlastnostech a chování nádoru. Mohou se vyskytovat v nádorových buňkách nebo na jejich povrchu, popř. volně v tělních tekutinách. Stanovujeme je proto přímo v tkáni nádoru (tj. buněčné nádorové markery) nebo jsou nádorem produkovány (tj. s nádorem asociované antigeny) nebo jsou produkovány hostitelem jako odpověď na přítomnost nádoru (tj. indukované nádorové markery) [23,24].

Mezi markery produkované nádorem se řadí onkofetální antigeny produkované fyziologicky především během vývoje lidského zárodku např. α -fetoprotein (AFP). Patří se také specifické antigeny, které se nacházejí i ve zdravé tkáni či orgánu např. prostatický specifický antigen (PSA), thyreoglobulin (Tg), karbohydrátový antigen (CA). Dále se do této skupiny člení proliferační a onkoplacentární antigeny, např. různé enzymy jako je laktát dehydrogenáza (LD), lidský hormon choriový gonadotropin (hCG) a další.

Markery asociované s nádorem jsou zastoupeny určitými proteiny v plazmě (např. ferritin) a receptory. Významným steroidním receptorem je např. marker rakoviny prsu, další významný receptor je GCC, který se nachází ve střevní sliznici.

Mezi nejnovější rakovinné markery patří i detekce genových mutací tzv. tumor-asociovaných genů [23].

Stanovení tumorových markerů by mělo mít 100% specifitu při co nejvyšší senzitivitě. Výhodou stanovitelnosti tumorových markerů je relativně nízký práh. Proto je možné odhalit přítomnost maligního onemocnění. Stanovení tumorových markerů se většinou provádí imunoanalytickými metodami např. RIA, IRMA a ELISA. V poslední době se často využívá fluorescenční či chemiluminiscenční značení [23,24]. Pozitivní hodnoty tumorového markeru vypovídají o vysoké specifičnosti a citlivosti. Vysoké hodnoty svědčí o pokročilém stádiu onemocnění [25]. Mezi biomarkery stanovené při nádorovém onemocnění žaludku patří:

- **CEA** (karcinoembryonální antigen) - glykoprotein, ve fetálním období tvořený buňkami sliznice střeva. V dospělosti je syntetizován buňkami střevní sliznice, žaludku a bronchů. Obsahuje vysoký obsah sacharidů a jeho molekulová hmotnost je 180-200 kDa.

Klinický význam: Asi 100% výskyt CEA ve tkáni se nachází při kolorektálním karcinomu. Dále je pozitivní u medulárního thyroideálního karcinomu, karcinomu plic, prsu a pankreatu.

Nevýhodou CEA je zvýšení také u některých nemaligních onemocnění [24]. CEA proto nelze využít pro screening a diagnostiku maligního tumoru, ale pouze ke sledování průběhu onemocnění. Biologický poločas toho nádorového markeru v séru je 14 dnů. Hodnota cut off je přibližně 5 µg/l. Hodnota vyšší než 10 µg/l znamená progresi maligního onemocnění. Senzitivita karcinomu žaludku je asi 50 % [26].

- **Komplexní glykokonjugáty** - jde o glykoproteiny produkované buňkami plodu, které řadíme mezi onkofetální antigeny. Tyto antigeny jsou značeny písmeny CA (carbohydrate antigen) a v kombinaci s číslem, které označuje o jakou buněčnou linii produkující příslušnou protilátku se jedná [25]. Příklady těchto glykokonjugátů jsou:

- **CA 72-4** - glykoproteinový antigen je definován jako epitop reagující s monoklonálními protilátkami B 72-3 připravenými imunizací tkání s metastázami karcinomu prsu. Při zpětné analýze bylo zjištěno, že tato protilátka reaguje s glykoproteinovým vysokomolekulárním komplexem mucinového charakteru o relativní molekulové hmotnosti přes 1 milion, který se nazýval též tumor associated glycoprotein -TAG 72 [24,27]..

Klinický význam: Využívá se ke sledování průběhu maligního onemocnění horního GITu. Biologický poločas tohoto nádorového markeru v séru je 3-7 dnů. Hodnota cut off je 7 kU/l.

Přepočítání 1 U/l = 0,8 µg/l. Při specifitě 95 % je senzitivita 40 - 45 % pro karcinom žaludku. Další význam má také pro kolorektální karcinom, karcinom pankreatu a ovariální karcinom [24].

- **CA 19-9** - také nazývaný GICA. Glykolipid, který je obsažen ve tkáni nebo se vyskytuje jako vysokomolekulární mucin v séru. CA 19-9 je derivát krevní skupiny Lewis (a). Kyselina sialová (neuraminová) je součástí CA 19-9 antigenní determinanty, jež působení neuraminidázy může narušit stanovení CA 19-9. Je to antigen o relativní molekulové hmotnosti 36 000.

Klinický význam: CA 19-9 má hlavní význam pro diagnostiku pacientů s gastrointestinálním nádorem. Určitý problém by mohli představovat lidé Lewis-a/-b negativní (3 až 7 % populace), u kterých nemůžeme předpokládat zvýšení CA 19-9 v průběhu nemoci [24,27]. Biologický poločas tohoto nádorového markeru v séru je 5 dnů. Hodnota cut off: přibližně 40 kU/l. Přepočítání 1 U/l = 0,8 µg/l. Hodnota vyšší než 104 kU/l znamená výskyt vzdálených metastáz. Zvýšená hodnota CA 19-9 v séru může značit zánětlivá či benigní onemocnění žaludku. Senzitivita karcinomu žaludku je zaznamenána ve 25 - 60 % případů [26]. Stanovení CA 19-9 má také význam při karcinomu pankreatu, kolorektálním karcinomu, karcinomu žlučových cest a mucinózním karcinomu ovaria [24].

Mezi nové markery onemocnění gastrointestinálního traktu se řadí i pepsinogen I a pepsinogen II vypovídající o stavu žaludeční sliznice, jejichž stanovením se bude zabývat v celé následující kapitole.

2.4.4 Rentgenové vyšetření

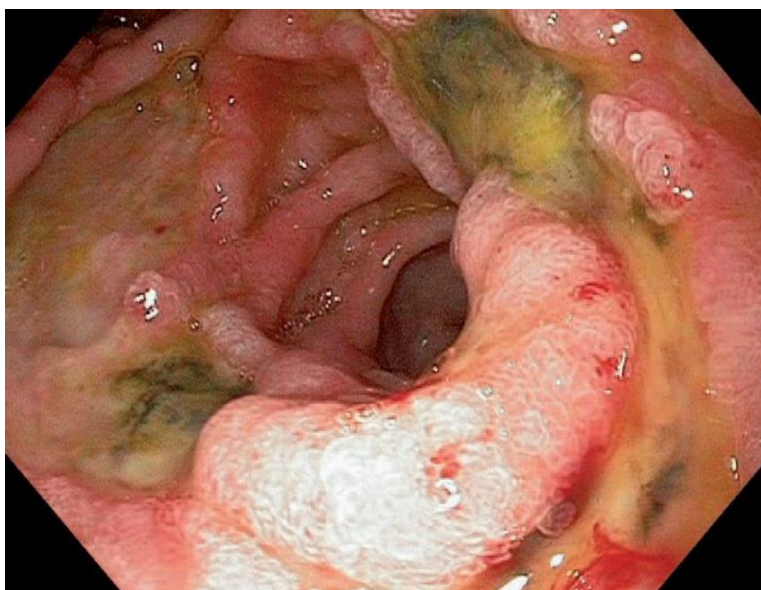
Rentgenové vyšetření je nejstarší zobrazovací metoda v lékařství, jejíž historie sahá do roku 1895, kdy Wilhelm Conrad Röntgen objevil rentgenové paprsky. Vyšetření je velmi levné, běžné, dostupné a bezbolestné. Nevýhodou této metody jsou škodlivé rentgenové paprsky. Proto se tato metoda využívá jen pro nezbytně nutné situace.

Skigrafické vyšetření (RTG) je využitelné pro všechny orgány v těle. Dává nám souhrnnou informaci o stavu pacienta [28]. V případě RTG vyšetření žaludku je nutné podat kontrastní látku v podobě kaše, kterou pacient nebo pacientka sní. Důvodem je fakt, že trávicí trubice není sama o sobě pro rentgenové paprsky dobře viditelná, proto se používá suspenze síranu barnatého. Poté se zhotoví několik snímků, na kterých je zobrazen tvar žaludku a jícnu. Při vyšetření sleduje lékař průchod látky na obrazovce rentgenového přístroje. Lékař může vidět zúžení a rozšíření trubice, výchlípky a polypy či pohyb svaloviny, tzv. peristaltiku. Aby se lépe zobrazila sliznice, používá se metoda dvojího kontrastu. Jedním kontrastem je malé množství baryové suspenze, druhým

kontrastem je plyn, který dostane do tubic buď polknutím malého množství granulátu uvolňujícího CO₂ nebo na opačném konci insuflací rektální rourkou [29].

2.4.5 Endoskopie

Nejpřesnější a nejpoužívanější metoda při vyšetření karcinomu žaludku je endoskopie. Tato vizuální metoda umožňuje nahlédnutí do dutiny břišní, ale také odebrání vzorků k histologickému vyšetření. Ohebný přístroj s vláknovou optikou (fibroskop) se zavádí orální cestou po znecitlivění kořene jazyka do trávicí trubice. Endoskopické vyšetření umožňuje zjistit příčinu obtíží a včas odhaluje karcinomy, které se zatím neprojevily žádnými příznaky (viz Obr. 6). Tento typ endoskopie při vyšetřování žaludku se nazývá gastrokopie [22]. Z hlediska pacienta to nejsou vyšetření příjemná, zato jsou ale velmi užitečná, protože mohou dokonce i léčit a nahradit operaci.



Obr. 6 - Pokročilý karcinom žaludku s exulcerovaným povrchem (převzato z [30])

2.4.6 Sonografie

Sonografie nebo-li ultrazvuk funguje na principu elektromagnetických vln, které závisí na zpětném odrazu. Tyto vlny pronikají do tkání a orgánů. Odrazy vln jsou

zachyceny ultrazvukovou sondou a zobrazeny. Sonografie je využívána častěji než RTG, protože neobsahuje škodlivé paprsky. Právě proto se tato zobrazovací metoda neřadí mezi agresivní metody [22], navíc se pro svoji dostupnost a nízké náklady při relativně velké „výtežnosti“ vyšplhala vysoko v žebříčku popularity mezi lékaři i pacienti. Přestože je průchod ultrazvuku omezen stěvním plynem, dá se probádat i stěna žaludku a tenkého a tlustého střeva. Vidíme jejich pohyb a dají se posoudit i tkáně v okolí [29].

2.4.7 PET/CT

Kombinace pozitronové emisní tomografie (PET) a počítačové tomografie (CT) se dnes řadí k nejmodernějším metodám. Výhodou této metody je vysoká senzitivita, specifita a časová úspora. CT zobrazuje různé orgány těla a jejich chorobné změny pomocí počítačového zobrazování rentgenového obrazu. Při tomto vyšetření je často nutné podat kontrastní látku do žíly nebo pacient takovouto látku musí vypít. Nejprve je provedeno CT vyšetření po podání radiofarmak a poté ihned navazuje PET vyšetření. PET metoda zobrazuje detekované tkáně po podání příslušných radiofarmak. V místech nádorů se hromadí radioaktivní látka. Anatomicko-morfologický obraz na CT skenech tak lépe odliší zobrazené tkáně, což umožní upřesnit a urychlit postupy pro terapeutickou léčbu [31].

2.5 Léčba

2.5.1 Chirurgická léčba

Chirurgická léčba je hlavní kurativní terapie pro léčbu karcinomu žaludku. Prognóza závisí na stádiu onemocnění. Úspěch chirurgické léčby také závisí na časně diagnóze [11]. Léčba časných karcinomů se řeší miniinvazivními technikami a to endoskopií a chirurgickou resekcí. Mezi časnými nádory se jedná o takové, které zasahují mukózu a eventuálně submukózu. Určujícím faktorem pro miniinvazivní postupy je postižení lymfatických uzlin, které je u tumorů mukózy 1-3 %, zatímco při zasažení submukózy se zvyšuje až na 20 %. Riziko postižení uzlin submukózních tumorů narůstá s velikostí nádoru. [32]. Cílem chirurgické léčby je bezpečné odstranění nádoru nebo celého žaludku. Nádor může být odstraněn chirurgicky a to laparoskopicky či klasicky

[32]. Klasická chirurgie se provádí resekcními výkony v oblasti distální části žaludku a kardii. Tato metoda je velmi účelná pro všechny věkové skupiny. Totální laparoskopická gastrektomie je bezpečně proveditelná i pro pokročilý karcinom. Tato metoda není v ČR tolik rozšířena, vyžaduje potřebné znalosti a zkušenosti. Úspěšnost chirurgické léčby je nepřímo úměrná pokročilost onemocnění. Proto včasná diagnostika a radikalita operace rozhoduje o další prognóze nemocných [19,32,33].

2.5.2 Chemoterapie

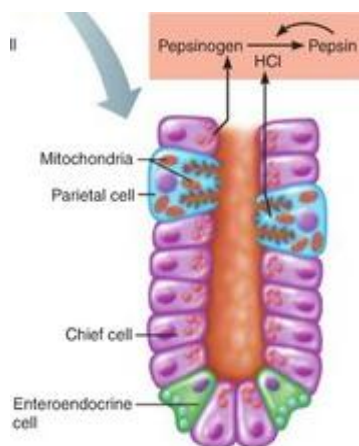
Při chemoterapii jsou používány k léčbě nádoru léky cytostatika, což jsou chemické látky, které ničí nádorové buňky. Podávají se nemocnému nitrožilně nebo ve formě tablet. Dnes se často používá kombinace cytostatik s tzv. targetovými léky (tj. monoklonální protilátky, antiangiogenezové preparáty a mnohé jiné). Tento způsob je nejperspektivnější ke zvýšení efektivity terapie pro svou menší toxicitu pro pacienta. [34]. Chemoterapii lze indikovat jako adjuvantní, neadjuvantní a v pokročilých stádiích paliativní léčbu. Adjuvantní nebo-li podpůrná chemoterapie se provádí po chirurgické léčbě. Cytostatika se podávají po operaci, aby se nerozšířila primární ložiska. Kdežto neadjuvantní se provádí před operací kvůli zmenšení nádoru či usnadnění operace. Cílem paliativní léčby není vyléčit, ale zlepšit kvalitu života a prodloužit jej [35]. Chemoterapie je aplikována často v kombinaci s radioterapií [36]. Tato léčba bývá spojena s nějakými nežádoucími účinky např. náchyllost k infekcím, poruchy srážení krve, nevolnost, zvracení, vypadávání vlasů, ztráta chuti k jídlu a další [37].

2.5.3 Radioterapie

Ozařování využívá schopnosti elektromagnetického záření (tj. gama záření či rentgenové záření) ke zničení nádorových buněk. Je to velmi přesná metoda, paprsky jsou cíleny na přesně vybranou oblast těla. Ozařování pacienta se provádí ve formě teleterapie (tj. ve vzdálenosti asi 100cm) či brachyradioterapie (tj. v těsné blízkosti ložiska). Pacient na ozařování chodí každý den po dobu 5 až 6 týdnů. Nežádoucí účinky jsou především nevolnost, zvracení, únava, postižení kůže a sliznice [37].

3 Pepsinogen

Pepsinogen (PG) je proenzym aktivního pepsinu, jenž je významným trávicím enzymem v žaludku. Je vylučován hlavními buňkami žaludeční sliznice a Brunnerovými buňkami duodena. Pepsinogen je přeměňován autokatalyticky, tzn. Působením dříve vzniklých molekul pepsinu na aktivní pepsin (viz Obr. 7). Tento děj probíhá v kyselém prostředí a zahajuje, tak trávení proteinů na směs různých peptidů o nízké molekulové hmotnosti. Tvorba pepsinogenu je ovlivňována řadou látek podílejících se na žaludeční sekreci. Mezi tyto látky zvyšující sekreci pepsinogenu patří gastrin, acetylcholin, pentagastrin a histamin. Atropin a H_2 receptory jsou naopak přímo zodpovědné za snížení tvorby pepsinogenu [3].



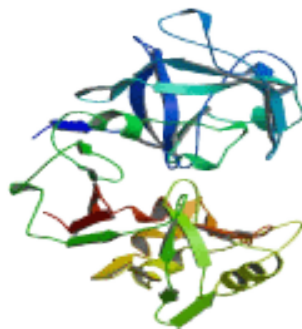
Obr. 7 - Přeměna pepsinogenu produkovaného hlavními buňkami žaludeční sliznice na pepsin působením HCl z parietálních buněk (převzato z [38])

Pepsinogen se dělí na tři biochemicky a imunologicky odlišné typy, a to na pepsinogen A (PGA, PGI), pepsinogen C (PGC, PGII) a katepsin E (SMP). Pomocí elektroforézy můžeme na agarózovém gelu rozlišit 8 proteáz žaludeční sliznice, pepsinogeny PG1 - PG5 tvoří skupinu imunologicky identických proteinů - pepsinogen I, pepsinogeny PG6 a PG7 tvoří skupiny pepsinogenu II a poslední protein odpovídá katepsinu E. Hladina pepsinogenů v krevním séru poukazuje na funkční a morfoloický stav žaludeční sliznice a má proto v diagnostice onemocnění žaludku [39,40].

3.1 Pepsinogen A

Pepsinogen A (viz Obr. 8) je vylučován hlavními buňkami těla žaludku. Je autokatalyticky přeměňován na aktivní pepsin A (EC 3.4.23.1) v kyselém prostředí. Pepsinogen A je možné elektroforeticky rozlišit na frakci PG1 - PG5, jenž zahrnují společné antigenní determinanty. Vyskytuje se nejen v krvi, ale také v moči [41]. Molekulová hmotnost pepsinogenu A je 42 500 Da a referenční hodnoty 30 - 120 $\mu\text{g/l}$ v séru [42,43].

Pepsinogen A je spojován s řadou žaludečních onemocnění od zánětu až po karcinom. Pepsinogen A je marker slizniční atrofie, subklinický marker vředové choroby duodena, snížen je u achlorhydrie [27]. Nízká hladina pepsinogenu A se nachází u pacientů se střevní metaplasíí, perniciózní anémií, atrofickou gastritidou, polypy a karcinomem žaludku [41]. Atrofická gastritida bývá často předchůdcem karcinomu žaludku. Zvýšená hladina pepsinogenu A v séru je u duodenálního vředu, méně často než u žaludečního vředu a syndromu Zollinger-Ellison [27]. Nejnovější studie prokazuje významné snížení pepsinogenu-I a současně zvýšení hladiny IgA protilátek *Helicobacter pylori* u karcinomu žaludku.



Obr. 8 - Terciární struktura pepsinogenu A (převzato z [44])

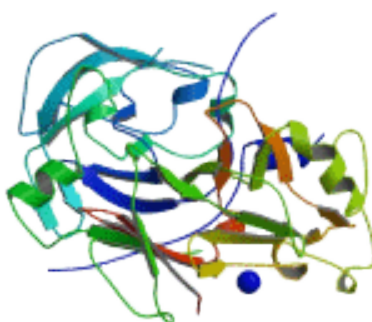
3.2 Pepsinogen C

Pepsinogen C (viz Obr. 9) je asparágová proteáza žaludeční sliznice. Neaktivní pepsinogen je přeměňován na aktivní pepsin C (EC 3.4.23.3), jenž zahajuje trávení proteinů. Tento děj probíhá v kyselém prostředí. Triviální název pepsinogenu C je gastricsin. Je vylučován buňkami z žaludeční kardie, žaludečního antra a z proximálního

dvanáctníku [41]. Jako PG6 - PG7 jsou označeny antigenní determinanty pepsinogenu C, které se rozlišují pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. Molekulová hmotnost pepsinogenu C je 31 000 Da a referenční hodnoty 4 - 22 µg/l v séru.

Pepsinogen C je spojován nejen s infekcí *Helicobacter pylori*, ale také má značný význam při karcinomu prsu a vaječnicků. Hladina pepsinogenu C se úměrně zvyšuje podle závažnosti zánětu žaludku v oblasti antra či korpusu. Pokud se sníží hladina pepsinogenu A, zánět je lokalizován pouze v korpusu.

Pepsinogen C může poskytnout dostatečné informace při diagnóze o ovariálním karcinomu. Při hodnotě tumorového markeru CA 125 nižší než 35U/ml můžeme zaznamenávat pepsinogen C [27,40,45].



Obr. 9 - Terciální struktura pepsinogenu C (převzato z [46])

3.3 Klinický význam pepsinogenu A/C

Při podezření na karcinom žaludku provádíme stanovení pepsinogenu I a II, ale také stanovení jejich poměru pepsinogenu I/II a dále stanovení tumorových markerů jako jsou např. CAE, CA 19-9, CA 72-4. Pro potvrzení výsledku se provádějí i jiná vyšetření jako je např. pentagastrinový test. Pentagastrinový test vyšetřuje žaludeční sekreci především produkci HCl. Dalším vyšetřením můžeme prokázat infekci *Helicobacter pylori*, jenž v žaludeční sliznici způsobuje vředové onemocnění.

Stanovení sérové hladiny pepsinogenů A a C má klinický význam, ovšem za nejvýhodnější variantu serologických markerů je dnes považováno stanovení poměru hladin obou pepsinogenů (PGI/PGII). Referenční hodnota poměru PGI/PGII je < 3. Poměr PGI/PGII signifikantně klesá v závislosti na histologickém riziku, nebo přítomnosti vacA+ pozitivitu *Helicobacter pylori* infekce. Stanovení hladiny PG I, poměru PG I/II, gastrinu-

17 a protilátek *Helicobacter pylori* se provádí neinvazivním testem GastroPanel pro diagnostiku gastritidy popř. jiného onemocnění. Pokud dojde ke snížení poměru PGI/PGII, snížení PGI a současně snížení gastrinu-17 jedná se o subklinický marker chronické gastritidy. Je-li zvýšená hodnota sérového PGII a snížená hodnota PGI, může se jednat o atrofickou gastritidu po infekci *Helicobacter pylori* [27,39].

Hladiny pepsinogenu I ≥ 70 ng/ml jsou považovány za referenční hodnoty. Pokud je hladina pepsinogenu I ≤ 70 ng/ml a poměru pepsinogenu I/II ≤ 3 , jedná se ji o karcinom žaludku či atrofickou gastritidu. O silně pozitivní test jde v případě, že naměřené hodnoty pepsinogenu I jsou ≤ 30 ng/ml [45]. Senzitivita vyšetření je 84 % a specifita 73 % [47].

Přítomnost atrofické gastritidy je navíc spojována se zvýšenou hladinou gastrinu a prozánětlivých cytokinů. V sérových vzorcích byly ve studii Sanduleana et al. analyzovány hladiny IL-8 a pepsinogenu A/C metodou ELISA [48]. Atrofická gastritida se projevuje jako zánětlivé onemocnění sliznice žaludku.

Poměr pepsinogenu I/II ovlivňuje více biochemických markerů, které jsou vysvětleny různými mechanismy např. malabsorpcí. Důsledkem atrofické gastritidy je potlačena produkce žaludeční kyseliny, což má za následek onemocnění malabsorpcí. Další onemocněním je dyspepsie, ta je spojená se sníženým příjmem potravy a snížením hormonu ghrelinu. Hormon ghrelin je produkován buňkami P/D1, které se nacházejí v části žaludku zvaném fundus. Zvýšená hladina sekrece toho hormonu „hladu“ je před jídlem. Tento hormon zvyšuje motilitu žaludku a využívá se k terapeutické léčbě gastrointestinálních zánětlivých stavů. Dále hormon ghrelin inhibuje sekreci inzulinu, což vede k onemocnění diabetes mellitus, ale naopak se využívá pro léčbu poruchy příjmu potravy. Hladina ghrelinu koreluje s hladinou pepsinogenu I a poměrem pepsinogenu I/II. Snížení poměru pepsinogenu I/II je příznivé pro prevenci nadváhy, i přestože atrofická gastritida je premaligním onemocněním rakoviny žaludku [49].

3.4 Metody stanovení pepsinogenu A a C

Laboratorní vyšetření je velmi důležité, informuje nás o fyziologických, tak i o patologických změnách v lidském organismu. Podle výsledků vyšetření je lékař schopen stanovit diagnózu a určit následnou léčbu pacienta. Provádí se základní, speciální a vysoce specializovaná vyšetření.

Neinvazivní screeningové testy jsou důležité pro odhalení tumoru v rané fázi. Bohužel v Evropě není v případě podezření na karcinom žaludku doposud všeobecný screeningový test, který by byl dostatečně senzitivní a specifický. Proto provádíme základní biochemické vyšetření. Vyšetření žaludku provádíme endoskopicky nebo provedeme odebrání vzorku k histologickému vyšetření. Ke stanovení hladiny specifických biomarkerů lze použít různé metody, které jsou blíže popsány níže. Měření koncentrace hladiny pepsinogenů v séru je většinou prováděno buď radioimunoanalýzou (RIA) nebo enzymovou imunoanalýzou (EIA) [24].

3.4.1 RIA

Radioimunoanalýza (RIA) je stále využívaná v klinické diagnostice, ale také v kriminalistice a soudním lékařství. Principem je imunochemická reakce antigenu se specifickou protilátkou. Antigen či protilátka je značená radioaktivní látkou, jenž umožňuje kvantifikaci stanovení. Nejpoužívanější radioizotopy ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S a ^{125}I , závislé na charakteru určované látky. Často se používá RIA metodika s ^{125}I -pepsinogenem v kompetitivním uspořádání.

Radioimunoanalýza je v kompetitivním uspořádání, ale lze použít i sendvičové uspořádání nazývané IRMA (imunoradiometrické stanovení). Výhodou této metody je dobrá cena, vysoká citlivost a nenáročnost. Kdežto nevýhodou je použití radioaktivního materiálu a nákladné zařízení [50,51,52].

3.4.2 EIA

Enzymová imunoanalýza (EIA) je imunologická metoda využívaná především v klinické, lékařské, biotechnologické a potravinářské analýze. Princip metody je založen na reakci antigenu se specifickou protilátkou. Typické je použití enzymu, který je kovalentně vázán na antigen či protilátku. Enzymy musí splňovat určitá kritéria, aby se mohly využít k imunoenzymatické analýze. Enzym musí mít dostatečně vysokou molekulovou hmotnost, musí být stabilní, schopen vazby a měl by poskytovat barevný produkt pro lepší detekci. Mezi tyto enzymy se řadí HRP (křenuv peroxidáza), ALP (alkalická fosfatáza), GOX (glukózooxidáza), AChE (acetylcholinesteráza) a galaktooxidáza. Aby tato reakce mohla proběhnout, musí být přidán substrát např. H_2O_2 pro HRP. Ke zviditelnění reakce se pak přidává chemická látka nazývaná chromogen.

Chromogeny jsou látky anorganického či organického charakteru jako např. o-fenylendiamin (OPD), tetramethylbenzidin (TMB), o-aminofenol, kyselina askorbová a další. V nedávných studiích byly navrženy jako substráty pro detekci tumorových markerů. Tyto testy chemické látky DBA (3,4-diaminobenzoová kyselina) a DAB (3,3-diaminobenzidin). Testy s použitím těchto nových substrátů se osvědčily, jelikož jsou jednoduché, levné, rychlé, reprodukovatelné a citlivé. Usnadní tak slibný a alternativní přístup ke klinické diagnóze. EIA obecně je ve spoustě ukazatelů velmi výhodnou metodou. Je dostatečně citlivá, selektivní, rychlá a mezi nezanedbatelné výhody patří také nízké náklady na provedení [53].

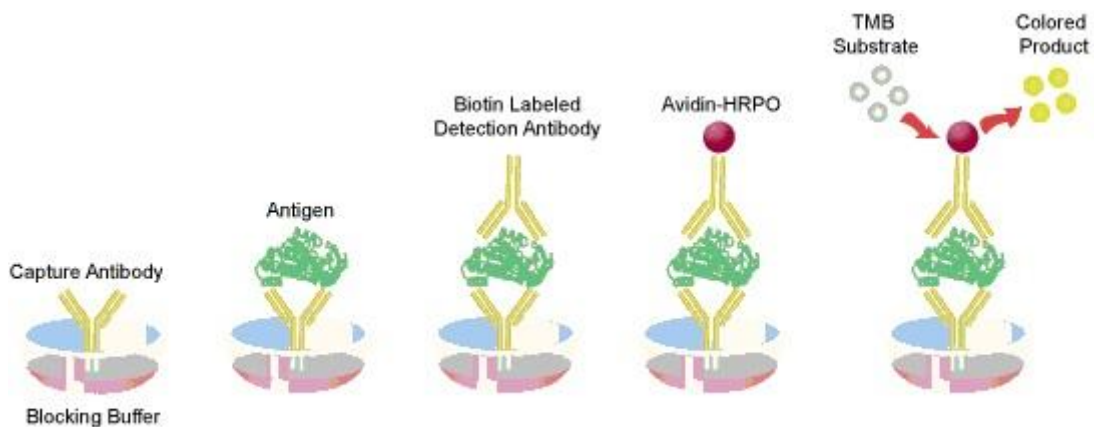
Mezi EIA metody se řadí technika ELISA, která je nejvyžívanější metodou detekce a kvantifikace v klinické praxi. Princip je opět založen na reakci antigenu se specifickou protilátkou. Antigen nebo specifická protilátka jsou v tomto případě, ale nekovalentně vázány na pevné fázi. Jako pevná fáze je využívána mikrotitrační destička (většinou 96 jamek) [54]. Metodu ELISA je možné provést ve dvojitým uspořádání a to kompetitivním popř. nekompetitivním.

3.4.3 Nekompetitivní ELISA

Nekompetitivní ELISA je označována také jako metoda „sendvičová“. Princip této metody spočívá v navázání stanoveného antigenu na specifickou protilátku, vázanou na pevné fázi. Na takto vzniklý imunokomplex se naváže sekundární protilátka, tzv. konjugát, která je enzymaticky značená. Barevnou změnu způsobenou enzymatickou přeměnou substrátu pak měříme spektrofotometricky [50].

Metodou lze stanovit titr specifických protilátek či koncentrace antigenu. V této metodě je důležité se rozhodnout mezi využitím monoklonálních protilátek či polyklonálních sér. V případě použití monoklonálních protilátek pro stanovení antigenu je potřeba vybrat dvě různé monoklonální protilátky rozlišující různé epitopy antigenu, tak aby bylo možné vytvořit požadovaný „sendvič“. Jedna monoklonální protilátka je pak vázána na pevné fázi a druhá by měla být značena enzymem a sloužit jako konjugát. Polyklonální séra rozlišují více epitopů téhož antigenu [55,56].

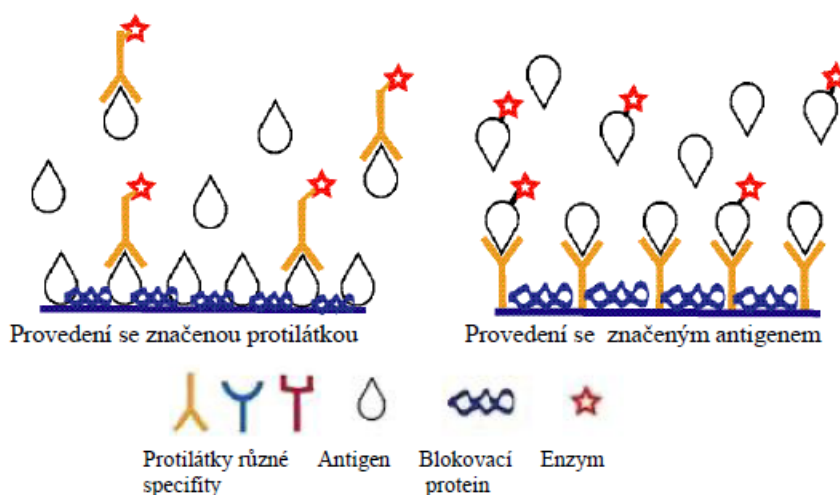
Určitou modifikací postupu je přidání komplexu avidin-biotin do reakce, což je možné vidět na (Obr.10). Reakce je pak založena na tvorbě pevné vazby mezi biotinem a avidinem. Přidáním tohoto komplexu do reakce má řadu výhod jako je zvýšení citlivosti detekce a využití minimálního množství protilátky a antigenu [57].



Obr. 10 - Schéma nekompetitivního uspořádání ELISA pro stanovení antigenu (převzato z [58])

3.4.4 Kompetitivní ELISA

Kompetitivní metoda se provádí také s imobilizovaným antigenem či protilátkou, ale v tomto uspořádání soutěží stanovený analyt o volná vazebná místa na protilátce s enzymaticky značeným analytem (tj. konjugátem), který se přidává do reakce. Značený antigen se naváže na imobilizované protilátky a přidáním substrátu vyvolá enzymatickou reakci. Barevná změna reakce se měří spektrofotometricky po separaci volné a na protilátku vázané frakce [50,59]. Kalibrační závislost je v tomto případě nelineární.



Obr. 11 - Kompetitivní formát ELISA vlevo imobilizovaný antigen, vpravo imobilizované protilátky (převzato z [60])

3.4.5 Skenovací elektrochemická mikroskopie

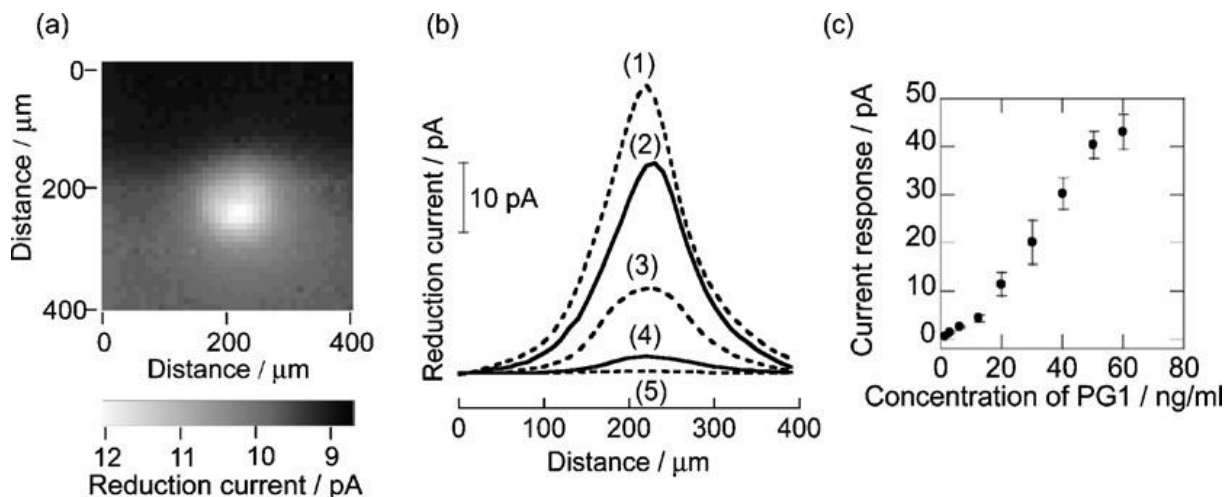
Z konce 80. let je první zmínka o technice skenovací elektrochemická mikroskopie (SECM), kterou popsali dva vědci Engström a Bard. Engström popsal možnost měření koncentračních profilů v roztoku a stanovení reakčních meziproduktů s krátkou životností, zatímco Bard vycházel ze základů STM (skenovací tunelová mikroskopie) a zaměřil se na interakci sondy s povrchem. Právě Bard popsal jev zpětné vazby, která je pro SECM velmi zásadní [61].

Tato technika pomocí sondy diskontinuálně skenuje povrch. Jako sonda je zde použita mikroelektroda, která během svého pohybu měří elektrochemické vlastnosti. Tímto způsobem dostáváme informace o skenovaném povrchu a z velikosti charakteru interakcí určujeme vlastnosti povrchu. Během měření skenovacími technikami získáme trojrozměrný obraz. Mezi skenovací metody sondou patří např. mikroskopie atomárních sil, skenovací tunelová mikroskopie nebo skenovací optická mikroskopie blízkého pole.

Technika SECM je velmi široce využívaná pro studium homogenních i heterogenních reakcí, dále pomocí ní můžeme studovat adsorpční a desorpční děje na povrchu a díky tomuto určovat vlastnosti látek. SECM se taktéž využívá při vývoji a určování charakteru biosenzorů, zejména těch enzymatických. Dále tato technika slouží ke studiu biologických systému a to při pozorování elektrochemických dějů na buněčné (fotosyntéza, redoxaktivní procesy a jiné) i nebuněčné úrovni (aktivita mitochondrií, DNA a další). Pomocí SECM byly také sledovány elektrochemické děje přímo v tkáních a dokonce *in vivo* v organismech [61].

Technika SECM má široké uplatnění, a navíc se v poslední době kombinuje i s jinými metodami. Jedna z těchto metod je právě ELISA. Kombinací metody SECM/ELISA lze detekovat molekuly antigenu v sendvičovém uspořádání. Pomocí mikroelektrody SECM, tak může detekovat imobilizované enzymy HRP. Výsledkem detekce je trojrozměrné zmapování látek v séru. Zobrazení SECM nám umožňuje zjištění vhodných biosenzorů. Pomocí této kombinované metody můžeme zjistit poměr koncentrací PG I/II a zjistit hladinu PG I s použitím mikrotitrační destičky. Pomocí výsledných hodnot můžeme diagnostikovat atrofickou gastritidu nebo karcinom žaludku. Princip této metody spočívá v zachycení protilátek IgG, antiPG I a anti PG II na skleněném substrátu. Přidáním značené protilátky dochází k vytvoření sendvičového imunokomplexu. Protilátka označená enzymem HRP v přítomnosti peroxidu vodíku katalyzuje ferrocenmethanol FcOH na oxidovanou formu ferrocenu a hydroxidů, které jsou pak

detekovány a zobrazovány technikou SECM. [62]. Účel tohoto experimentu je, určit v jaké vzdálenosti substrátu dojde k oxidaci FcOH po přidání roztoku H₂O₂ a tedy přítomnosti protilátek PG I a PG II [62].



Obr. 12 - SECM (a): zobrazuje typickou sendvičovou strukturu. Fc + OH se objevily jako bílé skvrny, v místech kde dochází k vysoké redukci proudu. V těchto místech je vysoká koncentrace protilátek PG I a PG II.

(b) zobrazuje na ose y vzdálenost PG I v různých koncentracích, která je detekována mikroelektrodami SCEM v μm a na ose x redukovaný proud pA. Graf nám pojednává za jakou vzdálenost je koncentrace PG I nejvyšší. V místech křivky zajišťuje maximální Fc + OH snížení proudu v různých koncentracích PG I, které jsou vypsané na Obr. 11(c).

(c) zobrazuje, že nejvyšší proud je při koncentraci PG I 60 ng/ml (převzato z [62]).

3.4.6 Stanovení míry fosforylace

Fosforylace lidských pepsinů a pepsinogenů pravděpodobně souvisí s různými žaludečními onemocněními. Pacienti s rakovinou žaludku vykazují vyšší stupeň fosforylace pepsinogenu než zdraví lidé. Pro stanovení fosforylací pepsinu a pepsinogenu byly použity metody jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) a afinitní chromatografie s imobilizovanými kovovými ionty (IMAC).

Metoda IMAC je založena na vazbě fosfátové skupiny nejčastěji s železitými ionty, které jsou imobilizovány na nosiči Sepharose 6B přes kyselinu imidodiacetátovou. IMAC metoda slouží ke studiu přítomnosti a charakterizaci fosfátových skupin pepsinu a lidského

pepsinogenu. Tato metoda je v poslední době velmi rozšířena a vyžaduje také vysoké nároky na čistotu. Aby tento problém byl vyřešen, provádí se IMAC metoda v kombinaci s RP-HPLC.

RP-HPLC je použita pro oddělení jednotlivých fosforylovaných proteinů.

Kombinace těchto metod má velmi dobrou reprodukovatelnost a mohla by sloužit pro časnou diagnostiku rakoviny žaludku [63,64,65].

Závěr

V této práci jsem se zabývala vlivem pepsinogenu A a pepsinogenu C na nádorové onemocnění žaludku. Z dostupné literatury se mi podařilo zjistit, že hladina těchto proteinů v séru určitým způsobem koreluje s výskytem onemocnění a proto slouží také jako biomarkery stanovované v souvislosti s diagnostikou onemocnění GIT. Pro stanovení koncentrace lze použít standardní metodu ELISA příp. se využívá kombinace SECM a „sendvičová“ ELISA, čímž lze získat větší množství informací. Tato kombinovaná metoda má své výhody i nevýhody. Mezi výhody patří především rychlá, spolehlivá a citlivá detekce. Nevýhodou je pak drahý a složitý systém.

Pomocí metody RIA a „sendvičové“ ELISA je ovšem také možné dostatečně a citlivě detekovat pepsinogen A a pepsinogen C. Stanovená referenční hodnota pepsinogenu A je v rozmezí 30 - 120 $\mu\text{g/l}$ a stanovená referenční hodnota pepsinogenu C je v rozmezí 4 - 22 $\mu\text{g/l}$. Pokud je naměřena hodnota v tomto rozmezí pepsinogenu A ≤ 70 ng/ml a poměr pepsinogenů A/C ≤ 3 , jedná se již o karcinom žaludku či atrofickou gastritidu. Senzitivita tohoto vyšetření je 84% a specifita 73%. Přítomnost atrofické gastritidy je navíc spojována se zvýšenou hladinou gastrinu, která je v referenčním rozmezí 5 - 115 ng/l .

V poslední době se také studuje souvislost míry fosforylace pepsinogenů s výskytem karcinomu žaludku. Zjistilo se, že v případě onemocnění žaludku je vyšší výskyt fosforylace, k jejíž detekci se používají především metody IMAC a RP-HPLC. Využití těchto metod vykazuje velmi dobrou reprodukovatelnost.

Seznam použité literatury

- [1] ČIHÁK, R. *Anatomie 2*. Upravil a doplnil Prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc. Praha: Anatomický ústav 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze, 2002. ISBN 80-247-0143-X.
- [2] ELIŠKOVÁ, M. a NAŇKA O. *Přehled anatomie*. Praha: Karolinium, 2006. ISBN 80-246-1216-X.
- [3] MAŘATKA, Z. *Gastroenterologie*. vydání první. Praha: Karolinium, 1999. ISBN 80-7184-561-2.
- [4] ELLIS, H. Anatomy of the stomach. *Surgery*. 2011, roč. 29, č. 11, 541 - 543. DOI: 10.1016/j.mpsur.2011.08.003. [cit.2012-06-25]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpsur.2011.08.003>.
- [5] PARRAMÓN, J. P. *Anatomie člověka*. Jirásek J. Praha: Svojtka a Vašut, 1996. ISBN 80-7180-029-5.
- [6] ROKYTA, R. *Fyziologie: pro bakalářská studia v medicíně ošetrovatelství, přírodovědných, pedagogických a tělovýchovných oborech*. vydání 2. přepracované. Praha: ISV, 2008. ISBN 80-86642-47-X.
- [7] TROJAN, S. a kol. *Lékařská fyziologie*. Vydání 4. přepracované a doplněné. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-247-0512-5.
- [8] LANGMEIER, M. *Základy lékařské fyziologie*. 1. vydání. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2526-0.
- [9] WILHELM Z. a HEGEI P. *Klinická fyziologie: Onemocnění žaludku. Praktické lékařství* [online]. 2006, roč. 2006, č. 3 [cit. 2012-05-21]. Dostupné z: <http://www.solen.cz/pdfs/lek/2006/03/15.pdf>.

- [10] DUŠEK, L., MUŽÍK, J., KUBÁSEK, M., KOPTÍKOVÁ, J., ŽALOUDÍK, J., VYZULA, R. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2012-6-17]. Dostupné z: <http://www.svod.cz>.
- [11] TESAŘ J. KRŠKA Z. ZEMAN M. *Karcinom žaludku a současnost. Rozhledy v chirurgii*. 2010, roč. 89, č. 3, 169 - 177.
- [12] PAFKO, P. et al. *Základy speciální chirurgie*. první vydání. Praha: Galén, 2008. ISBN 978-80-7262-402-7.
- [13] MAČÁK, J. a J. MAČÁKOVÁ. *Patologie*. první vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2005. ISBN 80-247-0785-3.
- [14] ŠACHLOVÁ, M., H. KOUKALOVÁ, M. KAPIČKOVÁ a O. ŠTĚPÁNKOVÁ. Vliv *Helicobacter pylori* na žaludeční karcinogenezi. *Klinická onkologie*. 2004, roč. 17, č. 4, 123 - 126.
- [15] VITALION.CZ. Rakovina žaludku [online]. 2012 [cit. 2012-07-05]. Dostupné z: <http://nemoci.vitalion.cz/rakovina-zaludku/>.
- [16] HOSKOVEC, D. Léčba karcinomu žaludku a gastroezofageální junkce. *Mladá fronta Zdravotnické noviny ZDN* [online]. 2012, č. 4, 6.4.2012 [cit. 2012-06-28]. ISSN 1214-7664. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/lecba-karcinomu-zaludku-a-gastroezofagealni-junkce-464248>.
- [17] SOBIN, L.H., M.K. GOSPORADOWICZ a Ch. WITTEKIND. WILEY A BLAKWELL. *TMN: Klasifikace zhoubných nádorů*. sedmé vydání. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, 2011. ISBN 978-80-904259-6-5. [cit. 2012-06-17]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/system/files/tnm-7.pdf>.
- [18] VOTRUBOVÁ, J. et al. *Klinické PET a PET/CT*. první vydání. Praha: Galén, 2009. ISBN 978-80-7262-619-9.

- [19] ŠIMŠA, J., HOCH, J. LEFFLER, J., BAVOR, P. a VAJTROVÁ, R. Karcinom žaludku - současná diagnostika a léčba. *Praktický lékař*. 2004, roč. 84, č. 1, 23 - 25.
- [20] NOVOTNÝ, I. Co nového přinesla endoskopie v diagnostice a terapii nemocí horní části gastrointestinálního traktu. In: Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně [online]. 2010, 23.04.2010 [cit. 2012-06-28]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/abstrakta/cislo/3712/>.
- [21] LUKÁŠ, K. a kol. Gastroenterologie a hepatologie pro zdravotní sestry. první vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2005. ISBN 80-247-1283-0.
- [22] MAŘATKA, Z. *Trávicí obtíže: v lékařské praxi*. první vydání. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-472-0.
- [23] MACHOVÁ I. BRÁZDOVÁ A. FUSEK M. ZÍDKOVÁ J. *Nádorové markery a jejich využití v klinické praxi*. *Chemické listy*. 2012, roč. 106, č. 1, 16 - 19.
- [24] ZIMA, T. *Laboratorní diagnostika*. Vydání první. Praha: Galén, 2002. ISBN 80-7262- 201-3.
- [25] RACEK, J. et al. *Klinická biochemie*. druhé, přepracované vydání. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-324-9.
- [26] Doporučení České společnosti klinické biochemie (ČSKB ČLS JEP). *ČASOPIS ČESKÉ SPOLEČNOSTI KLINICKÉ BIOCHEMIE A SPOLEČNOSTI LÉKAŘSKÉ GENETIKY* [online]. roč. 11, č. 1, 9. září 2008 [cit. 2012-06-18]. ISSN 1210 - 7921. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/TM/KBM-TM-dopor.pdf>.
- [27] KOPÁČ, J. *Lékařská a laboratorní diagnostika*. Turnov: Lékařská laboratoř, 2004.

- [28] MAJOR, D. Rentgenové vyšetření. *Mladá fronta Zdravotnické noviny* [online]. 28.9.2009 [cit. 2012-07-05]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-pacientske-listy/rentgenove-vysetreni-447310>.
- [29] MARKOVÁ, J. LÉKAŘIONLINE.CZ. *Vyšetřovací metody v gastroenterologii* [online]. 2012 [cit. 2012-07-04]. Dostupné z: <http://www.lekari-online.cz/vnitri-lekarstvi/zakroky/vysetrovaci-metody-v-gastroenterologii>.
- [30] TOMÁŠEK, J. Nádory žaludku. *Mladá fronta Zdravotnické novin* [online]. 2012, č. 2 [cit. 2012-06-18]. ISSN 1214-7664. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/nadory-zaludku-463621>.
- [31] VOTRUBOVÁ, J. a O. BĚLOHLÁVEK. PET/CT V KLINICKÉ PRAXI. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2005, roč. 7, č. 6 [cit. 2012-06-18]. ISSN 1803-5256. Dostupné z: <http://www.internimedicina.cz/artkey/int-200506-0007.php>.
- [32] GATĚK, J. Chirurgické léčení u karcinomu žaludku. Referátový výběr z onkologie. 2008, 3 - 4, 29 - 34.
- [33] MARTÍNEK, L., J. DOSTALÍK, I. GUŇKA a P. GUŇKOVÁ. Laparoskopická totální gastrektomie. *Rozhledy v chirurgii*. 2011, roč. 90, č. 7, 391 - 401.
- [34] ŠÁLEK, T. Rakovina žaludku. *Onkologie*. 2007, roč. 1, č. 2, 51 - 54.
- [35] ČESKÁ ONKOLOGICKÁ SPOLEČNOST ČESKÉ LÉKAŘSKÉ SPOLEČNOSTI JANA EVANGELISTY PURKYNĚ. Léčba [online]. 2012 [cit. 2012-06-28]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/pro-pacienty/lecba-17/>.
- [36] SVOBODA, T. Nechirurgická léčba karcinomu žaludku. *Referátový výběr z onkologie*. 2008, roč. 25, 3-4, 24 - 28.
- [37] DVOŘÁČKOVÁ, B. Co potřebujete vědět o nádorech žaludku. In: *Masarykův onkologický ústav* [online]. Brno: Masarykův onkologický ústav, 2003 [cit. 2012-06-18]. Dostupné z: www.mou.cz.

- [38] QUIZLET LLC. AP2 Final - Chapter 23: Digestive System [online]. 2012, May 4, 2012 [cit. 2012-07-05]. Dostupné z: <http://quizlet.com/11878437/ap2-final-chapter-23-digestive-system-flash-cards/>.
- [39] KAZUMASA, M. Gastric cancer screening using the serum pepsinogen test method. *Gastric Cancer*. 2006, č. 6, 245 - 253.
- [40] ROJOA, J. V., A. M. MERINO, L. O. GONZÁLEZC a F. VIZOSOD. Expression and clinical significance of pepsinogen C in epithelial ovarian carcinomas. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2002, č. 104, 58 – 63.
- [41] WESTERVELD, B. D. et al. Clinical Significance of Pepsinogen A Isozymogens, Serum Pepsinogen A and C Levels, and Serum Gastrin Levels. *Cancer*. 1987, č. 59, s. 952-958.
- [42] ŠTOSOVIÁ, T., HAVLIŠ, J., LENOBEL, R. a ŠEBELA, M. Proteolytické enzymy: Význam pro proteomiku. *Chemické listy*. 2005, č. 99, 896 - 905.
- [43] ÚSTAV LÉKAŘSKÉ BIOCHEMIE A LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY VFN A 1.LF UK. *Speciální metodiky a referenční meze*[online]. 13. ledna 2012 [cit. 2012-06-25]. Dostupné z: http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/glab_01.htm.
- [44] USCN LIFE SCIENCE INC. *Pepsinogen A (PGA)* [online]. CHINA, 2012 [cit. 2012-06-25]. Dostupné z: [http://www.uscnk.com/directory/Pepsinogen-A\(PGA\)-0165.htm](http://www.uscnk.com/directory/Pepsinogen-A(PGA)-0165.htm).
- [45] MARIO, F. di a L.G. CAVALLARO. Non-invasive tests in gastric diseases. *Digestive and Liver Disease*. 2008, č. 40, 523 - 530.
- [46] USCN LIFE SCIENCE INC. *Pepsinogen C (PGC)* [online]. CHINA, 2012 [cit. 2012-06-25]. Dostupné z: [http://www.uscnk.com/directory/Pepsinogen-C\(PGC\)-0166.htm](http://www.uscnk.com/directory/Pepsinogen-C(PGC)-0166.htm).

- [47] STAFANOVÁ, M. Epidemiologie, screening, současná diagnostika a staging karcinomu žaludku. *Česká společnost hepato-pankreo-biliární společnost* [online]. 2008 [cit. 2012-06-18]. Dostupné z: D:\III-6505\internet\Epidemiologie, screening, současná diagnostika.htm.
- [48] SANDULEANU, S. et al. Ratio between serum IL-8 and pepsinogen A/C: a marker for atrophic body gastritis. *European Journal of Clinical Investigation*. 2003, č. 33, 147 - 154.
- [49] TANAKA, M. et al. Pepsinogen I/II ratio is related to glucose, triacylglycerol, and uric acid levels. *Nutrition*. 2012, roč. 28, č. 4, 418 - 421.
- [50] STEJSKAL, V., HAJŠLOVÁ J. a KOCOUREK V. VĚDECKÝ VÝBOR FOTOSANITÁRNÍ A ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ. *Bioanalytické metody pro hodnocení bezpečnosti zemědělských surovin a produktů*. Praha, 2008 [cit. 2012-06-24]. Dostupné z: <http://www.phyotosanitary.org>.
- [51] Radioimunoanalýza (RIA). In: Inovace biochemických programů [online]. Brno, 2011, 23. 11. 2011 [cit. 2012-07-01]. Dostupné z: orion.sci.muni.cz/virtuallab/dokumenty/pdf/Radioimunoanalýza.pdf.
- [52] ZIMA, T. a kol. *Klinická a toxikologická analýzy*. první vydání. Praha: VŠCHT Praha, 2008. ISBN 978-80-86238-51-7.
- [53] XUE-MEI, L. et al. Electrochemical enzyme immunoassay using model labels. *Trends in Analytical Chemistry*. 2008, roč. 27, č. 6, 543 - 553.
- [54] LEQUIN, R. M. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*. 2005, roč. 51, č. 12, 2415 - 2418.
- [55] NAVRÁTILOVÁ, J. *Optimalizace detekce enzymu myeloperoxidasy v lidské plasmě metodou ELISA*. Brno, 2010. Bakalářská práce. MASARYKOVA UNIVERZITA. Vedoucí práce Mgr. Lukáš Kubala, Ph.D.

- [56] WALKER, J. M. a R. RAPLEY. *Medical Biomethods Handbook*. New Jersey: Humana Press, 2005, 419 - 427. ISBN 1-59259-870-6.
- [57] MOLECULAR DIAGNOSTIC SERVICES, Inc. Avidin Biotin Methods [online]. San Diego, 2011 [cit. 2012-07-01]. Dostupné z: <http://www.mds-usa.com/avidbiomethods.html>.
- [58] LEINCO TECHNOLOGIES. *Sandwich ELISA Protocol* [online]. Missouri, 2012 [cit. 2012-06-24]. Dostupné z: http://www.leinco.com/sandwich_elisa.
- [59] WALKER, J. M. a R. RAPLEY. *Medical Biomethods Handbook*. New Jersey: Humana Press, 2005, 419 - 427. ISBN 1-59259-870-6.
- [60] Technical Guide for ELISA. KIRKEGAARD & PERRY LABORATORIES. *KPL - power your immunoassays* [online]. Maryland, 2005 [cit. 2012-07-05]. Dostupné z: <http://www.kpl.com>.
- [61] LACINA, K., SKLÁDAL, P. a NAGY, G. *Skenovací elektrochemická mikroskopie. Chemické listy*. 2012, č. 106, 253 - 263.
- [62] YASUKAWA, T. et al. Enzyme immunosensing of pepsinogens 1 and 2 by scanning electrochemical microscopy. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007, č. 22, 3099 - 3104.
- [63] HYNEK, R., VAŇKOVÁ, H., TESAŘOVÁ, H. a KAS, J. DEGREE OF PHOSPHORYLATION OF PEPSINOGEN IN GASTRIC CANCER. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2001, roč. 24, č. 18, 2801 - 2814.
- [64] MOSS, J. A. a COYLE, A.R. Tandem IMAC-HPLC purification of a cocaine-binding scFv antibody. *Journal of Immunological Methods*. 2003, roč. 281, 1 - 2, 143 - 148.

- [65] KUČEROVÁ, Z. a MAJERCAKOVÁ, P.. Immobilized-metal-ion affinity chromatography as a tool for the qualitative study of pepsinogen phosphorylation. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2001, č. 49, 523 - 531.

