

## LFIA V MEDICINÁLNÍ DIAGNOSTICE RAKOVINNÉHO BUJENÍ

ARAM ZOLAL, BARBORA ĎURČIOVÁ, KAMILA  
SYSLOVÁ a PETR KAČER

Vysoká škola chemicko technologická, Technická 5,  
166 28 Praha 6  
Petr.Kacer@vscht.cz

Došlo 16.8.16, přijato 14.11.16.

Klíčová slova: nádorové markery; LFIA; imuno-  
chromatografie, imunoanalýza na membráně

### Obsah

1. Úvod
2. Detekce v laterálním toku na membráně (LFIA)
  - 2.1 Složení LFIA
  - 2.2. Uspořádání LFIA
3. Použití LFIA k detekci rakovinných markerů
  - 3.1. Rakovinné markery
  - 3.2. LFIA pro detekci nádorových markerů
4. Závěr

### 1. Úvod

Během vývoje a růstu se tkáň a orgány vyvíjejí z jediné buňky pomocí diferenciací. Jde o nesmírně komplexní a také silně regulovaný proces v organismu. Rakovinné bujení vzniká v případě, kdy se normální buňky vymknou homeostatické kontrole a začnou se neregulovaně dělit. Takové buňky vznikají nejčastěji v důsledku nahromadění několika mutací a selháním jak opravného mechanismu, který je schopný poškození DNA opravit, tak i imunitního systému, který za normálních okolností atypické buňky odstraňuje. Tyto buňky ztrácí kontrolu nad svým dělením, růstem, diferenciací i kontrolovanou buněčnou smrtí (apoptózou), což vede ke vzniku nádorového onemocnění. Takto nově vzniklé buňky se odlišují od normální tkáň tvarově i funkčně. Benigní nádory rostou pomalu, jsou většinou dobře diferencované od normální tkáň (nepronikají do ní) a netvoří metastázy (sekundární nádory). Maligní (zhoubné) nádory rostou rychle, metastazují a prorůstají do okolních tkání a způsobují tak její destrukci. Vznik nádorového onemocnění je komplexní a dlouhodobý proces, na kterém se podílejí jak faktory genetické, tak faktory vnějšího prostředí. Přeměna tkáň organismu do invazivního stavu (odvíjí se od typu nádoru) trvá v průměru 5 až 10 let (cit. <sup>1,2</sup>).

Podle světové zdravotnické organizace (WHO) bylo v roce 2012 nově diagnostikováno více než 14 miliónů lidí s rakovinným bujením a přibližně 8,2 miliónů lidí tomuto onemocnění ve stejném roce podlehl<sup>3</sup>. S těmito čísly se tak rakovina celosvětově řadí mezi vedoucí příčiny nemocnosti a úmrtnosti.

Jednou z cest, jak identifikovat rakovinné onemocnění, či sledovat jeho progres, je analýza tělních tekutin a sledování koncentračních hladin předem vytipovaných biologických markerů. Biomarker je definován jako měřitelný indikátor normálního i abnormálního biologického procesu či odpovědi na farmakologickou léčbu<sup>4</sup>. Nádorové markery jsou látky produkované nádorem, nebo organismem samotným jako odpověď na rakovinné bujení. Tyto látky jsou přítomny v organismu postižených pacientů ve zvýšených koncentracích a nejvíce se v klinické praxi využívají k monitorování úspěšnosti léčby. Mnoho výzkumných institucí ovšem spatřuje jejich využití i v časně diagnostice nádorových onemocnění<sup>4,5</sup>.

Diagnostické testy s laterálním tokem (LFIA) se dnes těší poměrně velké oblibě i rozšíření, a to pro své nesporné výhody. Stejně tak je výhodou i univerzálnost použití těchto testů – dnes se používají LFIA v mnoha velmi rozdílných odvětvích, např. v zemědělství, medicíně diagnostice, k detekci drog či environmentálnímu testování. Neméně důležitou vlastností je i jednoduchost výroby, která se později projevuje i v příznivé ceně produktu<sup>6</sup>. LFIA tak tvoří ideální nástroj pro detekci biomarkerů různých druhů rakovinných onemocnění.

### 2. Detekce v laterálním toku na membráně (LFIA)

Imunochemické metody využívají k důkazu a stanovení detegované látky specifické interakce s protilátkami. *In vitro* se při nich využívá produkt imunitního systému organismu původně zaměřený na specifické rozlišení a zneškodnění cizorodého antigenu. Protilátky umožňují citlivé a specifické rozpoznání analytu v komplexních biologických vzorcích (např. moč, krevní plazma, mozkomíšni mok a kondenzát vydechaného vzduchu)<sup>7</sup>.

Metoda LFIA spojuje princip papírové chromatografie a imunochemických metod, za vzniku jednoduchého testu v podobě proužku, který je vhodný pro rychlou a citlivou detekci antigenů přítomných v tělních tekutinách pacientů. Jde o tzv. point-of-care test, u kterého není potřeba laboratorního vybavení (testování může probíhat u pacienta, bez dohledu proškoleného personálu), je rychlý, levný a zároveň specifický a citlivý<sup>8</sup>. Metoda využívá kolorimetrické detekce antigenu díky barevně značeným protilátkám. Princip detekce je vysvětlen níže.

## 2.1. Složení LFIA

Lateral flow testy se připravují ve dvou možných uspořádáních lišících se typem detegovaných analytů: (1) přímé (také označované jako „sendvičové“ uspořádání) se využívá pro detekci větších analytů, např. virů, proteinů; (2) kompetitivní uspořádání se využívá pro detekci malých analytů, u kterých je nemožné navázání dvou protilátek současně.

Společné pro lateral flow testy je složení z jednotlivých částí (obr. 1): absorpční podložky pro nanášení vzorku, konjugační zóny, membrány a podložky pro nasávání vzorku. Všechny tyto části jsou lepeny na plastovou podkladovou kartu.

Velmi důležitými prvky LFIA jsou na membráně umístěné dvě detekční linie – testovací a kontrolní. Tyto linie jsou odpovědné za detekci sledovaného analytu ve vzorku a o jejich složení rozhoduje právě volba uspořádání (přímé vs. kompetitivní uspořádání).

Nejdůležitější součástí testu je tzv. konjugát. Jde o primární protilátku značenou barevnou nanočásticí. Tento konjugát je schopen se vázat na daný analyt i na detekční linie (a tím je zbarvit) a zprostředkovat tak informaci o přítomnosti či absenci analytu ve vzorku.

## 2.2. Uspořádání LFIA

### *Přímé uspořádání LFIA*

Přímé uspořádání se využívá pro detekci analytů o větších rozměrech, které ve své struktuře obsahují více antigenních míst (minimálně dvě). Testovací linie je v tomto případě tvořena primárními protilátkami proti sledovanému analytu.

Pokud vzorek obsahuje sledované analyty, dojde v konjugační zóně k vytvoření komplexu mezi analytem a primární protilátkou, která je značená barevnou nanočásticí. Komplex antigen-značená primární protilátka vlivem kapilárních sil vzlíná přes membránu k oblasti testovací linie, která je tvořena imobilizovanými primárními protilátkami proti sledovanému analytu, které reagují

s antigenem na jiném antigenním místě než primární protilátka z konjugační zóny. Následně dojde k navázání antigenu na tyto protilátky a testovací linie se zbarví barevnými koloidními nanočásticemi. V případě, že vzorek sledovaný antigen neobsahuje, postupuje komplex antigen-značená primární protilátka až ke kontrolní linii, aniž by zbarvil linii testovací. Kontrolní linie je tvořena imobilizovanými sekundárními protilátkami proti primárním protilátkám. Sekundární protilátky vytvářejí komplex s primárními označenými protilátkami pocházející z konjugační zóny.

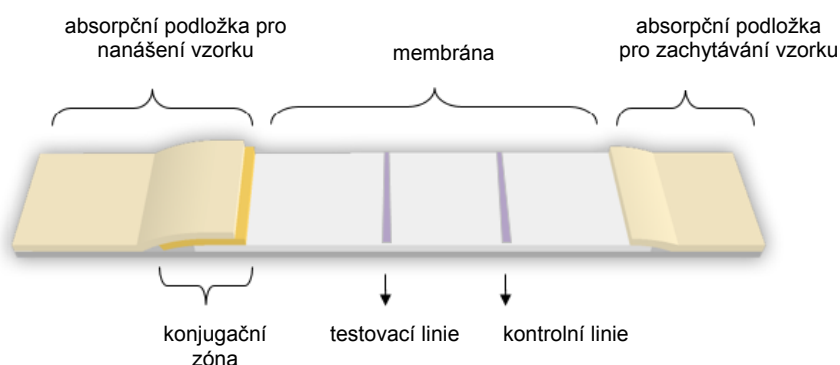
V případě pozitivního testu (vzorek obsahuje sledovaný antigen) vznikají na LFIA dvě linie (testovací a kontrolní). Naopak negativní výsledek LFIA je charakterizován vznikem pouze kontrolní linie.

### *Kompetitivní uspořádání LFIA*

Kompetitivní uspořádání se používá pro detekci menších analytů obsahujících jedno antigenní místo. Testovací linie je v tomto případě tvořena sledovaným analytem zakotveným v proteinovém nosiči, schopném vazby na membránu.

U přímého kompetitivního uspořádání je barevnou nanočásticí značená primární protilátka určená k vychytávání sledovaného analytu. Pokud vzorek obsahuje sledovaný analyt, dochází na konjugační zóně k jejich vychytání značenými primárními protilátkami. Testovací linie je v tomto případě tvořena sledovaným analytem vázaným nejčastěji na BSA (bovine serum albumin), z čehož plyne, že komplex antigen-značená primární protilátka již není schopna se na tuto linii vázat a tím ji zbarvit. Kontrolní linie je opět tvořena imobilizovanými sekundárními protilátkami proti primárním protilátkám. Sekundární protilátky vytvářejí komplex s primárními značenými protilátkami pocházejícími z konjugační oblasti.

V případě pozitivního testu (vzorek obsahuje sledovaný antigen) vzniká na LFIA v kompetitivním formátu pouze kontrolní linie. A naopak negativní výsledek LFIA je charakterizován vznikem dvou linií (testovací a kontrolní).



Obr. 1. Typické uspořádání LFIA

Nepřímé kompetitivní uspořádání se od přímého příliš neliší. V konjugační zóně se nachází primární protilátka vázaná na sekundární protilátku, která je značena barevnou koloidní nanočásticí. Testovací linie je stejného složení jako u uspořádání přímého kompetitivního, tj. antigen vázaný na BSA. Kontrolní linie je tvořena imobilizovanými protilátkami proti sekundárním protilátkám. Vizualizace výsledků probíhá totožným způsobem<sup>6</sup>.

### 3. Použití LFIA k detekci rakovinných markerů

#### 3.1. Rakovinné markery

Podle definice formulované a přijaté na 5. Mezinárodní konferenci o lidských nádorových markerech ve Stockholmu v roce 1988 (The Fifth International Conference on Human Tumor Markers, Stockholm, Sweden 1988) jsou tumorové markery charakterizovány jako látky, které vznikají v nádorových buňkách a jsou sekretovány do tělních tekutin, kde je lze kvantifikovat neinvazivními metodami. Vzhledem ke korelaci koncentrace těchto markerů s aktivní hmotou nádoru jsou tumorové markery nápomocné při léčbě onkologických pacientů<sup>1</sup>.

Mezi vlastnosti ideálního nádorového markeru patří vysoká klinická senzitivita (pravděpodobnost, že pacient s pozitivním výsledkem testu má hledané nádorové one-

mocnění), vysoká klinická specifita (pravděpodobnost, s jakou má pacient bez diagnostikovaného maligního onemocnění negativní výsledek laboratorního testu) a zároveň jeho koncentrace v tělních tekutinách koreluje s velikostí nádoru, stádiem onemocnění a účinností terapie. Je ovšem nutné zdůraznit, že žádný ze známých markerů nevykazuje všechny tyto vlastnosti<sup>1,9</sup>.

V klinické praxi je běžně používáno několik desítek nádorových markerů užitečných při monitorování úspěšnosti léčby a včasném zachycení recidivy onemocnění. V tab. I jsou uvedeny rakovinné biomarkery používané v klinické praxi v onkologické indikační skupině. Pokroky v oblasti genomických a proteomických technologiích, včetně technologie genových čipů, SAGE technologie, dvojdimenzionální elektroforézy a hmotnostně spektrometrických technik spolu s pokroky v bioinformatice, přinášejí vysoká očekávání na objev nových citlivých a specifických biomarkerů, které jsou v důsledku onemocnění (nejen onkologických) sekretovány do tělních tekutin. Tuto skutečnost komplikuje fakt, že komplexní biologické matrice obsahují velké množství proteinů a ostatních látek (metabolitů, lipoproteinů apod.), které činí screening matic a hledání nových využitelných markerů velmi zdlouhavým<sup>10</sup>. Zajímavým novým přístupem je stimulace nádorových buněk k tvorbě biomarkerů v dostatečné koncentraci již v raných stádiích onemocnění a jejich následná detekce<sup>11</sup>.

Tabulka I

Rakovinné biomarkery používané v klinické praxi dle National Cancer Institute

Biomarker	Matrice	Indikace
AFP	krev	rakovina jater
b2M	krev, moč, mozkomíšni mok	mnohočetný myelom, chronická lymfocytární leukémie
b-hCG	krev, moč	choriokarcinom, rakovina varlat
CA15-3/CA27.29	krev	rakovina prsu
CA19-9	krev	rakovina slinivky, žlučníku
CA-125	krev	rakovina vaječnicků
CALC	krev	karcinom štítné žlázy
CEA	krev	rakovina kolorekta, rakovina prsu
CD20	krev	non-hodgkinův lymfom
CgA	krev	NET pankreatu
Cytokeratinové fragmenty 21-1	krev	rakovina plic
Fibrin/fibrinogen	moč	rakovina močového měchýře
HE4	krev	rakovina vaječnicků
Imunoglobuliny	krev a moč	mnohočetný myelom
Laktátdehydrogenasa	krev	nádory ze zárodečných buněk
NMP22	moč	rakovina močového měchýře
PSA	krev	rakovina prostaty
Ova1	krev	rakovina vaječnicků

V praxi se využívá několik metod, kterými lze nádorové markery z biologických matric detegovat. Mezi tyto metody patří imunanalytická analýza biologických tekutin, imunohistochemické vyšetření biotických vzorků a metody molekulární biologie resp. genové exprese nádorových buněk. Snahou je vyvíjet screeningové metody co nejméně invazivní. Z tohoto pohledu jsou nevhodnější imunochemické analýzy tělních tekutin<sup>1</sup>.

### 3.2. LFIA pro detekci nádorových markerů

V následující kapitole je uvedeno několik případů klinicky používaných a uznávaných biomarkerů nádorových onemocnění, pro které existují testy ve formátu LFIA. Některé testy jsou za použití elektronických čteček schopny kromě kvalitativní analýzy i kvantitativního vyhodnocení testovaného vzorku.

Většina LFIA testů pro níže zmíněné biomarkery je však určena pro odborný zdravotnický personál a chybí testy dostatečně triviální a vhodné pro domácí testování (tzv. point-of-care testy), které by pomohly asymptomatickým pacientům v rizikových skupinách odhalit onemocnění v počátečních stádiích a tím zvýšit šance na jejich přežití.

#### *Karcinoembryonální antigen*

Karcinoembryonální antigen (CEA) je markerem mnoha druhů nádorových onemocnění (např. rakoviny prsu, kolorekta, plic atd.) a je také jedním z nejdéle používaných v klinické praxi. Největší uplatnění nachází při testování pacientů, kteří již mají za sebou úspěšnou léčbu, ale je u nich riziko návratu rakovinného bujení a při určování stadia onemocnění.

Jako biomarker je však nevhodný pro populační screening a pro diagnózu v raných stádiích onemocnění<sup>12</sup>.

#### *Alfa-fetoprotein*

Dalším často používaným markerem nádorového onemocnění je  $\alpha$ -fetoprotein (AFP). Jedná se o marker rakoviny jater a varlat. Pokud pacient po orchiektomií prokazuje stálý koncentrační nárůst AFP, je rakovina ve druhém či ve vyšším stádiu. U více než 60 % pacientů s rakovinou jater dochází ke zvýšené sekreci AFP, je tedy vhodné využít tento biomarker ke sledování účinku terapie. Bylo provedeno také několik poměrně úspěšných populačních screeningů<sup>7,13</sup>.

#### *Karbohydrátový antigen 125*

Nejdůležitějším markerem rakoviny vaječnicků je karbohydrátový antigen 125 (CA125). U tohoto typu rakoviny se používá ke sledování účinnosti terapie a výrazně tak napomáhá zvládnutí celkové léčby. CA125 se dále v omezené míře používá k odhalení rakoviny vaječnicků (zvýšená koncentrační hladina tohoto markeru však nestačí k určení diagnózy) a monitoringu pacientů s rakovinou prsu a plic.

Vyšší sekrece CA125 vzniká bohužel i při řadě nenádorových onemocnění, což znemožňuje jeho použití pro screening populace pro rakovinu vaječnicků<sup>7,14</sup>.

#### *Karbohydrátový antigen 19-9*

Karbohydrátový antigen (CA 19-9) je běžně používaný nádorový marker, který je spojen především s nádory trávicího traktu, zejména s rakovinou slinivky břišní, tlustého střeva, žlučníku, jater a jícnu. Využití nachází především u rakoviny slinivky břišní, kde slouží jak k identifikaci onemocnění, tak k monitoringu léčby<sup>7,15</sup>.

#### *Prostatický specifický antigen*

Jde v současnosti o nejdůležitější klinicky používaný nádorový marker karcinomu prostaty, což je u mužů druhé nejčastější rakovinné onemocnění. Vzhledem k faktu, že jde o marker vysoce selektivní i specifický, je v USA doporučen populační screening i u asymptomatických jedinců, což může pozitivně přispět k včasné diagnóze v raných stádiích onemocnění. LFIA testy pro prostatický specifický antigen (PSA) jsou tak velmi dobře dostupné a rozšířené<sup>7,16</sup>.

#### *Protein jaderné matrix 22*

Protein jaderné matrix 22 (NMP22) je proteinem vyskytujícím se v buněčném jádře a svou funkcí zasahuje do syntézy DNA i regulaci exprese genů. Je také markerem karcinomu močového měchýře (nekontrolované dělení buněk a tím pádem i syntézy DNA). LFIA test pro NMP22 je vyvinut na detekci přímo z moči pacienta, což výrazně usnadňuje testování<sup>7,17</sup>.

#### *Lidský choriový gonadotropin*

Protein (lidský choriový gonadotropin (hCG)), který není nutno dlouze představovat, jelikož již dlouhou dobu používá k určení těhotenství (tzv. těhotenské testy, které jsou první skutečnou komerční aplikací LFIA). Kromě toho jde o biomarker rakoviny varlat<sup>7,18</sup>.

#### *Fibrinové degradační produkty (FDP)*

Fibrinové degradační produkty (FDP) se obvykle používají ke zjišťování trombotických stavů, nicméně jsou zejména v poslední době využívány také jako marker kolorektálního karcinomu a karcinomu močového měchýře (ale i dalších typů rakovinných onemocnění)<sup>7,19,20</sup>.

## 4. Závěr

Rakovinná onemocnění jsou dnes všude po světě velmi rozšířená a nebezpečná. Ročně zemře na rakovinné onemocnění přes 8 miliónů lidí, přičemž za mnohá úmrtí může i pozdní diagnóza pacientova stavu. Včasná diagnóza by v řadě případů pomohla zachránit lidský život, nicméně populační screeniny klasickými analytickými metodami jsou téměř nemožné a tak vznikla snaha vytvořit tzv. point-of-care testy, schopných detekce rakovinných markerů. Tyto testy by jedinec v rizikové skupině provedl sám a v případě pozitivního výsledku by podstoupil další vyšetření, která by potvrdila či vyvrátila výskyt nádorového onemocnění.

Za tímto účelem vznikla celá řada testů založených na LFIA, které si kladly za cíl pomoci odhalit dané onemocnění již v raných stádiích. V řadě případů se bohužel setkáváme s malou specifitou daného biomarkeru a tím i vytvořeného testu. V poslední době se však začínají objevovat tzv. multiplexové LFIA testy pro rakovinná onemocnění. Tedy testy schopných detekce několika biomarkerů najednou (i biomarkerů méně významných a markerů nepoužívaných dosud v klinické praxi), čímž se zvýší specifita testu při zachování selektivity. Tyto nástroje personalizované medicíny založené na principu point-of-care mohou v budoucnu zachránit díky včasné diagnóze rakovinných onemocnění mnoho životů.

*Tato práce se uskutečnila v rámci Národního programu udržitelnosti (NPU I LO1215) MŠMT – 34870/2013 a TAČR (TA04010838).*

#### Seznam použitých zkratk

AFP	alfa-fetoprotein
β2M	β-2-mikroglobulin
CA	karbohydrátový antigen
CALC	calcitonin
CD20	B-lymfocytární antigen
CEA	karcinoembriónální antigen
hCG	lidský choriový gonadotropin
HE4	lidský nadvarlatový protein 4
LFIA	lateral flow immunoassay
NMP 22	nuclear matrix protein 22
Ova 1	5-protein signature
PSA	prostatický specifický antigen
WHO	Světová zdravotnická organizace
FDP	fibrinové degradační produkty

#### LITERATURA

1. Sunwoo H. H., Suresh M. R., v knize: *The Immunoassay Handbook* (Wild D., Kodak E), kap. 56, Elsevier, Amsterdam 2013.
2. <http://www.cancer.org/cancer/index>, staženo 20. června 2016.
3. Stewart B. W., Wild C. P.: *World Cancer Report*. WHO, Ženeva 2014
4. Strimbu K., Tavel J. A.: *Curr. Opin. HIV AIDS* 5, 463 (2010).
5. Aronson J. K.: *Br. J. Clin. Pharmacol.* 59, 491 (2005).
6. Wong R. C., Tse H. Y.: *Lateral Flow Immunoassay*. Humana Press, New York City 2009.
7. Wild D.: *The Immunoassay Handbook*. Elsevier, Amsterdam, 2013.
8. McPartlin D. A., O’Kennedy R. J.: *Expert Rev. Mol. Diagn.* 14, 979 (2014).

9. Klener P., Zíma T., Kalousová M., Malbohan I. M., v knize: *Laboratorní diagnostika* (Zíma T., ed.), kap. 17. Galén, Praha 2013.
10. Chatterjee S. K., Zetter B. R.: *Future Oncol.* 1, 37 (2005).
11. Kwong G. A., Von Maltzahn G., Murugappan G., Abudayyeh O., Mo S., Papayannopoulos I. A., Sverdlov D. Y., Liu S. B., Warren A. D., Popov Y., Schuppan D., Bhatia S. N.: *Nat. Biotechnol.* 31, 63 (2013).
12. Duffy M. J., Van Dalen A., Haglund C., Hansson L., Klapdor R., Lamerz R., Nilsson O., Sturgeon C., Topolcan O.: *Eur. J. Cancer* 39, 718 (2003).
13. Liang R. L., Xu X. P., Liu T. C., Zhou J. W., Wang X. G., Ren Z. Q., Hao F., Wu Y. S.: *Anal. Chim. Acta* 891, 277 (2015).
14. Bast R. C., Xu F. J., Yu Y. H., Barnhill S., Zhang Z., Mills G. B.: *Int. J. Biol. Markers* 13, 179 (1998).
15. Perkins G. L., Slater E. D., Sanders G. K., Prichard J. G.: *Am. Fam. Physician* 68, 1075 (2003).
16. Velonas V. M., Woo H. H., dos Remedios C. G., Assinder S. J.: *Int. J. Mol. Sci.* 14, 11034 (2013).
17. Moonen P. M. J., Kiemeny L. A. L. M., Witjes J. A.: *Eur. Urol.* 48, 951 (2005).
18. Duzendorfer U., Jurincic C.: *Urol. Int.* 42, 248 (1987).
19. Small-Howard A. L., Holden H.: *J. Immunoassay Immunochem.* 31, 131 (2010).
20. <http://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-fact-sheet>, staženo 20. června 2016.

**A. Zolal, B. Durciová, K. Syslová, and P. Kačer**  
(*University of Chemistry and Technology, Prague*): **LFIA in Medical Diagnostics of Cancer**

Tumor markers are an important part of diagnosis and monitoring the progress of treatment for many types of cancer. The number of discovered biomarkers is currently growing also thanks to the improving analytical methods. Clinically used as well as newly discovered biomarkers may contribute to the early diagnosis of a cancer, which increases the patient's chance of recovery. The limiting factor is the lack of so-called point-of-care tests, particularly due to often low selectivity and specificity of the markers. Recently so-called multiplex assays that are able to detect a larger amount of the tumor markers of the type of disease and thus increase the specificity of the test are developed. This article briefly describes the clinically used tumor markers for which there is a test as lateral flow immunoassay (LFIA).