

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2025

Michaela Jindrová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Karcinoembryonální antigen

Bakalářská práce

University of Pardubice
Faculty of chemical technology

Carcinoembryonic antigen
Bachelor Thesis

2025

Michaela Jindrová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Michaela Jindrová**
Osobní číslo: **C22201**
Studijní program: **B0914P360019 Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Karcinoembryonální antigen**
Téma práce anglicky: **Carcinoembryonic Antigen**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**
Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Vypracujte literární rešerši, ve které bude popsána role karcinoembryonálního antigenu v lidském organismu a jeho detekce.
2. V teoretické části práce zevrubně popište nejvýznamnější členy patřící do rodiny karcinoembryonálních antigenů. Dále se věnujte popisu fyziologických a patologických procesů, kterých se karcinoembryonální antigen účastní. Popište změny koncentrací karcinoembryonálního antigenu jakožto nádorového markeru u různých typů malignit. V poslední části bakalářské popište metody detekce karcinoembryonálního antigenu.

Experimentální část:

1. V rámci praktické části se zaměřte na detekci karcinoembryonálního antigenu u nádorových buněk. V dílčích krocích se věnujte optimalizaci imunofluorescenční metody pro detekci karcinoembryonálního antigenu.
2. Získaná experimentální data zpracujte a diskutujte. Výsledky práce následně porovnejte s výstupy jiných autorů.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Ke zpracování literárního přehledu využijte elektronické vědecké databáze (*ScienceDirect, NCBI, PubMed, Web of Science*)

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Jan Čapek, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Antonín Vlček**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2025**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan
V Pardubicích dne 28. února 2025

L.S.

prof. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Práci s názvem Karcinoembryonální antigen jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30.6. 2025

Michaela Jindrová

PODĚKOVÁNÍ

V této části bych chtěla poděkovat především vedoucímu této bakalářské práce Mgr. Janu Čapkovi, Ph.D. za jeho trpělivost a podporu při zpracovávání teoretické ale hlavně praktické části, která se na této práci značně podepsala. Dále bych chtěla poděkovat konzultantovi této práce Mgr. Antonínu Vlčkovi za cenné rady při realizaci praktické části a také své rodině a kamarádům za motivaci a podporu.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá rodinou proteinů známých jako karcinoembryonální antigeny, zejména skupinou CEACAM, a jejich expresí na povrchu nádorových buněk. Teoretická část klasifikuje tuto skupinu proteinů, popisuje její genetickou expresi a vyjadřuje potenciální využití této skupiny v klinické praxi. Teoretická část dále blíže charakterizuje konkrétní skupinu CAECAM, její strukturu, vlastnosti a fyziologickou funkci v lidském organismu spolu s podrobnějším popisem nejznámějších členů této skupiny. Poslední část teoretické části popisuje nejvyužívanější analýzy pro klinickou detekci těchto proteinů. Experimentální část zahrnuje stanovení titru vhodných primárních protilátek anti-CEACAM5 pro imunohistochemickou analýzu, využití této stanovené hodnoty k detekci povrchových markerů u buněčné linie N87, a nakonec vizualizaci jader a aktinových vláken těchto buněk.

KLÍČOVÁ SLOVA

Karcinoembryonální antigen, biomarker, imunoanalýza

TITLE

Carcinoembryonic antigen

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with a family of proteins known as carcinoembryonic antigens, in particular the CEACAM group, and their expression on the surface of tumour cells. The theoretical part classifies this group of proteins, describes their genetic expression and expresses the potential use of this group in clinical practice. The theoretical part further characterizes the specific CAECAM group, its structure, properties and physiological function in the human organism, together with a more detailed description of the most well-known members of this group. The last part of the theoretical part describes the most used assays for clinical detection of these proteins. The experimental part includes the determination of the titer of appropriate anti-CEACAM5 primary antibodies for immunohistochemical analysis, the use of this determined value to detect surface markers in the N87 cell line, and finally the visualization of the nuclei and actin filaments of these cells.

KEYWORDS

Carcinoembryonic antigen, biomarker, immunoassay

OBSAH

1. ÚVOD	14
2. TEORETICKÁ ČÁST	15
2.1 Karcinoembryonální antigen.....	15
2.1.1 Genetická exprese a regulace CEA.....	16
2.1.2 Karcinoembryonální antigen v onkologii	17
2.2 Skupina molekul CEACAM	18
2.2.1 Struktura a vlastnosti CEACAM	18
2.2.2 Fyziologická funkce CEACAM.....	19
2.2.3 Popis proteinu CEACAM1	20
2.2.4 Popis proteinu CEACAM5	22
2.2.5 Popis proteinu CEACAM6	26
2.2.6 Další faktory ovlivňující hladinu CEACAM	28
2.3 Detekce CEA	29
2.3.1 Elektrochemiluminiscenční imunoanalýza	31
2.3.2 Enzymová imuno-sorbční imunoanalýza.....	33
2.3.3 Mikročásticová enzymová imunoanalýza.....	35
2.3.4 Chemiluminiscenční imunoanalýza	35
2.3.5 Radioimunoanalýza	37
2.3.6 Imunohistochemie.....	38
3. CÍLE PRÁCE.....	40
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
4.1 Pomůcky a přístroje	41
4.2 Seznam použitých chemikálií	41
4.3 Příprava roztoků.....	42
4.4 Biologický materiál.....	43
4.4.1 Kultivace buněčné linie N87.....	43

4.5 Stanovení vhodného ředění protilátek	44
4.6 Detekce povrchových markerů buněk	44
4.6.1 Cytokeratin 18.....	44
4.6.2 Karcinoembryonální antigen.....	45
4.7 Vizualizace buněčné morfologie	46
4.7.1 Vizualizace aktinových vláken cytoskeletu.....	46
4.7.2 Vizualizace buněčných jader	46
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	47
5.1 Optimalizace titru primární protilátky	47
5.2 Detekce vybraných povrchových markerů	48
5.3 Vizualizace cytoskeletu a jader buněk.....	49
6. ZÁVĚR	50
7. POUŽITÁ LITERATURA	51

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1. Organizace genomu rodiny genů CEA.....	16
Obrázek 2. Strukturální vzhled vybraných CEACAM	19
Obrázek 3. Schéma přímé sendvičové metody ELISA.....	34
Obrázek 4. Optimalizace koncentrace primární protilátky proti CEACAM5 u buněk N87.....	47
Obrázek 5. Detekce povrchových markerů CEA a CK18 u buněk N 87.....	48
Obrázek 6. Vizualizace aktinových vláken a buněčných jader linie N87	49
Tabulka 1. Nomenklatura karcinoembryonálního antigenu	20
Tabulka 2. Stavy spojené se zvýšenou hladinou CEACAM	29
Tabulka 3. Porovnání imunologických metod s hm. spektrometrií	30
Tabulka 4. Porovnání metod ELISA, ECL, CLIA a RIA	37

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

CEA – Karcinoembryonální antigen (*Carcinoembryonic antigen*)

CEACAM – Molekuly buněčné adheze související s CEA (*Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule*)

PSG – Glykoproteiny specifické pro těhotenství (*Pregnancy-specific glycoprotein*)

CRC – Kolorektální karcinom (*Colorectal cancer*)

GPI – Glykosylfosfatidylinositolová vazba (*Glycosylphosphatidylinositol*)

ITIM – Imunoreceptorový tyrozinový inhibiční motiv (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*)

IEL – Intraepiteliální lymfocyty (*Intraepithelial lymphocytes*)

PDAC – Duktální adenokarcinom pankreatu (*Pancreatic ductal adenocarcinoma*)

HCC – Hepatocelulární karcinom (*Hepatocellular carcinoma*)

HSC – Hematopoetické kmenové buňky (*Hematopoietic stem cell*)

LT-HSC – Dlouhodobé hematopoetické kmenové buňky (*Long-term hematopoietic stem cell*)

CPG – Cytosin-fosfát-guanin (*Cytosine-Phosphate-Guanine*)

ADC – Konjugáty protilátka – lék (*Antibody-drug conjugates*)

BCP-ALL – Akutní lymfoblastická leukemie s prekurzory B-buněk (*B-precursor acute lymphoblastic leukaemia*)

MS – Hmotnostní spektrometrie (*Mass spectrometry*)

ECL – Elektrochemiluminiscence (*Electrochemical luminescence*)

ELISA – Enzymová imuno-sorbční analýza (*Enzyme-linked immuno-sorbent assay*)

MEIA – Mikročasticová enzymová imunoanalýza (*Microparticle enzyme immunoassay*)

CLIA – Chemiluminiscenční imunoanalýza (*Chemiluminescent immunoassay*)

RMP – Referenční postup měření (*Reference measurement procedure*)

CA – Karbohydrátový antigen (*Carbohydrate antigen*)

PSA – Prostatický specifický antigen (*Prostate-specific antigen*)

MUC1 – Mucin 1

CdS QD – Kvantové tečky ze sulfidu kademnatého (*Cadmium sulfide quantum dots*)

EIA – Enzymová imunoanalýza (*Enzyme immunoassay*)

HRP – Křenová peroxidáza (*Horseradish peroxidase*)

CLEIA – Chemiluminiscenční enzymová imunoanalýza (*Chemiluminescent enzyme-linked immunoassay*)

IHC – Imunohistochemie (*Immunohistochemistry*)

FFPE – Fixované formaldehydem, parafinem zalévané (*Formalin-fixed, paraffin-embedded*)

FITC – Fluorescein isothiokyanát (*Fluorescein isothiocyanate*)

TRITC – Tetramethylrhodamin (*Tetramethylrhodamine*)

CK18 – Cytokeratin 18

1. ÚVOD

Karcinoembryonální antigeny se obecně řadí do rodiny vysoce glykosylovaných glykoproteinů, které hrají důležitou roli při embryonálním vývoji lidského plodu. Tyto proteiny zajišťují především mezibuněčnou adhezi a signalizaci, tím napomáhají při vytváření nových tkání. Do této rodiny lze zařadit například skupiny CEACAM či glykoproteiny specifické pro těhotenství, které jsou geneticky exprimovány na chromozomu 19q13.2. Tyto skupiny se liší jak strukturně, tak i funkcí.

Skupina CEACAM proteinů je ukotvena na povrchu buněk, buďto pomocí glykosylfosfatidylinositolové vazby nebo prostřednictvím transmembránových domén. Díky tomu jsou členové této skupiny využíváni v klinické praxi jako biomarkery a slibné terapeutické cíle u melanomu, rakoviny plic, tlustého střeva, slinivky břišní, karcinomu pankreatu a nemalobuněčného karcinomu plic. Avšak nejčastějším klinickým využitím pro biomarker CEACAM zůstává sledování recidivy tkáně kolorektálního karcinomu.

K detekci těchto antigenů jsou využívány především metody založené na imunologii nebo méně běžné technologie založené na hmotnostní spektrometrii, které se zaměřují ale především na menší třídy molekul jako například vitamínů či aminokyselin. Nejčastěji využívána metoda v klinické praxi na detekci CEACAM v séru je enzymová imuno-sorbční imunoanalýza, která je snadná a levná, avšak nemá tak vysokou citlivost jako jiné modernější metody. Pro experimentální účely je nejčastěji aplikována elektrochemiluminiscenční imunoanalýza či chemiluminiscenční imunoanalýza, tyto analýzy mají větší citlivost a jsou rychlejší, avšak peněžně méně dostupné. Pro detekci CEACAM v tkáni se využívá metoda imunohistochemie.

Cílem této práce bylo určit vhodný titr primární protilátky anti-CEACAM5 u buněčné linie gastrických lidských buněk N87, pomocí tohoto stanoveného titru detekovat vybrané markery na povrchu této buněčné linie a orientační vizualizace jader a aktinových vláken v těchto buňkách, vše pomocí imunofluorescenční metody. Tyto získané hodnoty a informace by mohli posloužit jako základní kameny pro další rozmanitější výzkumy či k optimalizaci imunofluorescenční metody v rámci detekce karcinoembryonálního antigenu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Karcinoembryonální antigen

Obecně známo, antigen je jakákoli molekula v organismu schopná vyvolat imunitní odpověď. Jsou to obecně zpravidla proteiny nacházející se na povrchu buněk: bakterií, virů, či jiných cizorodých buněk. Tyto povrchové molekuly slouží k vyvolání imunitní reakce organismu, ve formě tvorby specifických protilátek. Je možné je dělit do skupin dle původu nebo specifity. Mezi membránové antigeny sloužící v klinické praxi jako biomarkery patří například CD antigeny, karcinoembryonální antigen, mucin 1 nebo prostatický specifický membránový antigen.

Karcinoembryonální antigen (CEA; *Carcinoembryonic antigen*) obecně je skupinou molekul, které působí jako adhezivní neboli vazebné molekuly živých buněk. Podílejí se na tvorbě nových tkání během embryonálního vývoje člověka a následně udržují jejich integrity. Skupina CEA se skládá ze složitých, vysoce glykosylovaných makromolekul, které zahrnují několik členů s odlišnými funkcemi v mezibuněčné adhezi a signalizaci (Hammarström et al. 1999).

Historie karcinoembryonálního antigenu začala v první polovině 60. let 20. století, kdy se začal podstatně rozvíjet výzkum nádorových markerů. Za objevitele CEA jsou považováni Phil Gold a Samuel O. Freedman, kteří v roce 1965 publikovali přelomovou studii, v níž popsali přítomnost specifického antigenu v nádorové tkáni kolorektálního karcinomu, který nebyl nalezen ve zdravé dospělé tkáni, ale byl přítomen v embryonální tkáni zažívacího traktu (Gold et al. 1965). Tento objev byl jedním z prvních důkazů o existenci onkofetálních antigenů.

Název „karcinoembryonální antigen“ odráží přítomnost těchto proteinů jak v karcinomech, tak v embryonálních tkáních. Objev CEA znamenal průlom v diagnostice nádorových onemocnění, protože byl jedním z prvních biomarkerů používaných v klinické praxi ke sledování progresu nádoru a hodnocení účinnosti léčby (Hammarström 1999). V průběhu 70. a 80. let 20. století se CEA postupně prosadil jako standardní nádorový marker, zejména u kolorektálního karcinomu. Jeho specificita a senzitivita však nebyly absolutní (Duffy 2001).

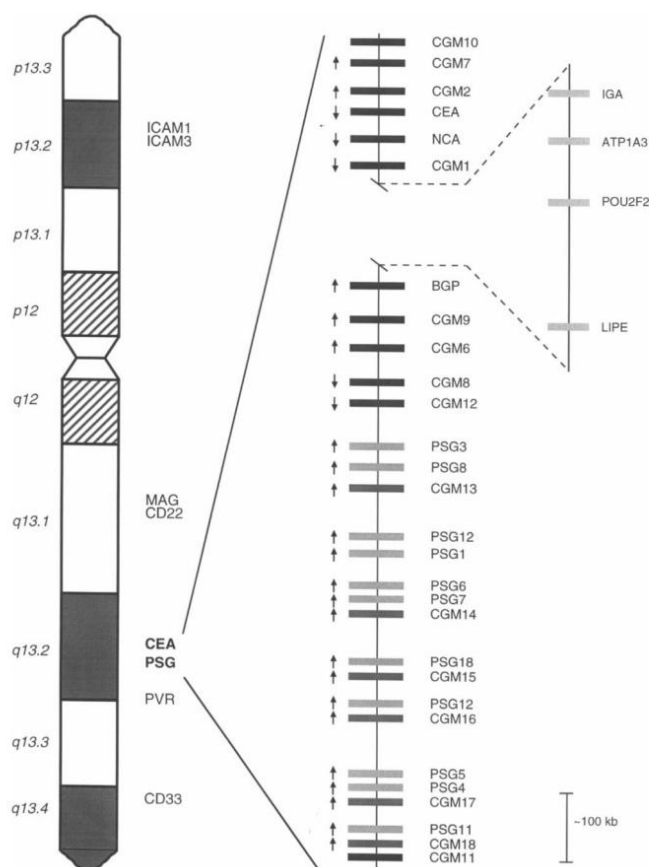
Tato skupina karcinoembryonálních antigenů patří do superrodiny imunoglobulinů. Tato rodina zahrnuje více než 20 členů, které lze dělit do dvou základních skupin: skupina karcinoembryonálních antigenů souvisejících s buněčnými adhezivními molekulami (CEA/CEACAM; *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule*) a skupina těhotensky specifických glykoproteinů (PSG; *Pregnancy-specific glycoprotein*). Tyto skupiny

mají společné strukturní podobnosti, zejména přítomnost domén podobných Ig, které umožňují buněčnou adhezi a interakci s dalšími molekulami (Beauchemin et al. 2013). V posledních letech roste zájem o molekuly CEACAM jako potenciální cíle imunoterapie.

2.1.1 Genetická exprese a regulace CEA

Karcinoembryonální antigen je kódován 29 geny, z nichž 18 je exprimováno (Hammarström et al. 1999). Porovnání nukleotidových sekvencí těchto genů ukazuje, že je lze rozdělit do tří podskupin: podskupina CEA/CEACAM obsahující 12 členů, podskupina PSGs obsahující 11 členů a třetí podskupina obsahující šest členů (Zid et al. 2013, Hammarström et al. 1999).

V podskupině CEACAM je exprimováno pouze sedm členů a zbytek tvoří pseudogeny, které nejsou exprimovány. Bylo prokázáno, že všechny geny PSG mohou být exprimovány. Třetí skupinu tvoří výhradně pseudogeny, které nejsou exprimovány vůbec. Členové rodiny genů CEA se nacházejí v oblasti o velikosti 1,8 megabáze na chromozomu 19q13.2. Tyto skupiny jsou rozděleny na dvě části úsekem genů, které nejsou příbuzné skupině CEA (Hammarström et al. 1999).



Obrázek 1. Organizace genomu rodiny genů CEA (Hammarström et al. 1999).

Kategorizace karcinoembryonálních antigenů je založena na následujících kritériích: homologie proteinů, vývojové vzorce exprese a skutečnost, že CEACAM jsou obvykle ukotveny na povrchu buněk, zatímco PSG jsou výhradně vylučovány. Rozdílná exprese jednotlivých CEACAM na různých typech lidských buněk je podmíněna přítomností jednoho nebo více CEACAM na většině buněk (Nagaishi et al. 2006).

2.1.2 Karcinoembryonální antigen v onkologii

Karcinoembryonální antigen se během života zdravého dospělého člověka tvoří v zanedbatelném množství. Jeho hladina však může být výrazně zvýšena v případě přítomnosti karcinomu. Vyšší předoperační hladiny CEA jsou spojeny s pokročilým nebo metastazujícím onemocněním, a tudíž s horší prognózou. Bylo prokázáno, že pooperační nevrácení CEA na fyziologické hodnoty svědčí o reziduálním nebo recidivujícím onemocnění (Hall et al. 2019).

Karcinoembryonální antigen je nespecifický sérový biomarker, který je zvýšený u různých malignit, mimo jiné u kolorektálního karcinomu, medulárního karcinomu štítné žlázy, karcinomu prsu a mucinózního karcinomu vaječníků. Vzhledem k tomu, že zvýšené sérové hladiny CEA jsou spojeny s různými typy zhoubných i nezhoubných onemocnění, nejsou definitivním markerem konkrétního místa vzniku rakoviny (Kankanala et al. 2024).

Nejčastějším klinickým využitím této technologie je sledování recidivy tkáně kolorektálního karcinomu (CRC; *Colorectal cancer*) (Simon et al. 2016). Kromě toho se hladiny CEA příležitostně měří i u pacientů bez anamnézy CRC (Hall et al. 2019). Současná studie navíc prokázala, že exprese CEA úzce souvisí s jaterními metastázami, které jsou hlavní příčinou úmrtí na kolorektální karcinom (Lee et al. 2017).

Primární důvody, které jsou základem účinnosti CEA jako sérového nádorového markeru, zejména v kontextu kolorektálního karcinomu a vybraných dalších malignit, lze pravděpodobně přičíst přirozené stabilitě této molekuly, její minimální expresi ve zdravé dospělé tkáni a její zvýšené hladině v nádorových tkáních (Hammarström et al. 1999).

Bylo prokázáno, že karcinoembryonální antigen má schopnost inhibovat smrt cirkulujících nádorových buněk. Dále bylo zjištěno, že protein CEA se váže na heterogenní jaderný RNA vazebný protein M4, což je receptorový protein exprimovaný Kupfferovými buňkami. Tato vazba aktivuje Kupfferovy buňky, což vede k sekreci různých cytokinů, které modifikují mikroprostředí pro přežití buněk kolorektálního karcinomu v játrech. Následně bylo zjištěno, že CEA vyvolává aktivaci molekul spojených s buněčnou adhezí. Úzká souvislost mezi CEA

a rakovinou podnítila zkoumání mnoha přístupů zaměřených na CEA jako protinádorové terapie (Lee et al. 2017).

Absence bazální lamely u maligních buněk v tlustém střevě usnadňuje neomezenou proliferaci ve tkáni. Navíc u nádorových buněk dochází ke ztrátě polarity, což má za následek uvolnění CEA na povrchu buněk. To následně usnadňuje jeho vstup do krevního oběhu přes mezibuněčné spoje (Hammarström et al. 1999).

2.2 Skupina molekul CEACAM

Členové CEACAM1, CEACAM5 a CEACAM6 skupiny CEACAM hrají roly při onemocněních souvisejících s imunitním systémem a rakovinou a jsou nyní považovány za platné klinické biomarkery a slibné terapeutické cíle u melanomu, rakoviny plic, tlustého střeva, slinivky břišní (Thomas et al. 2023), karcinomu pankreatu (Meng et al. 2017) a nemalobuněčného karcinomu plic (Grunnet et al. 2012).

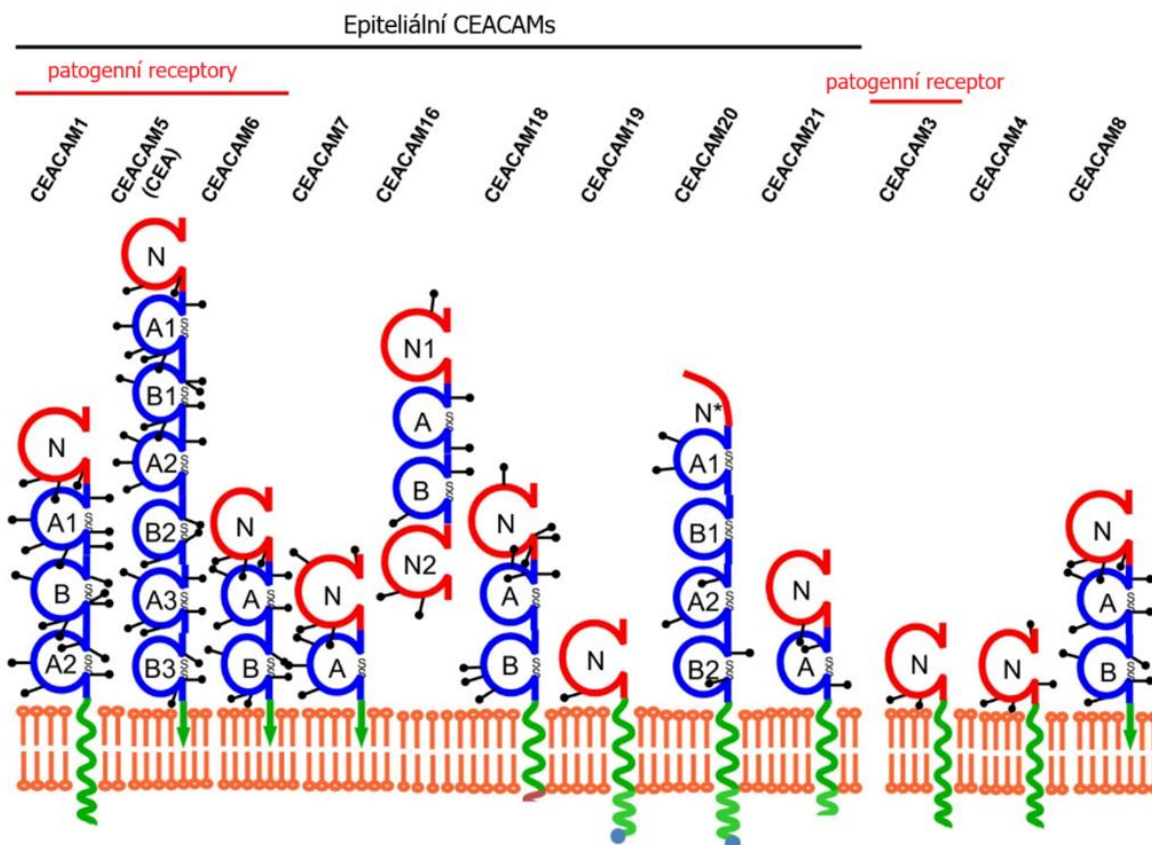
Pokud jde o fyziologickou křetvorbu, CEACAM1 a CEACAM6 jsou silně exprimovány v myeloidní linii na povrchu myelocytů, metamyelocytů a neutrofilních a eozinofilních granulocytů. V důsledku toho lze tyto proteiny využít jako biomarkery u jiných onemocnění, například hematologických (Ismail et al. 2017).

2.2.1 Struktura a vlastnosti CEACAM

Karcinoembryonální antigeny jsou adhezní molekuly s molekulovou hmotností v přibližném rozmezí 180–200 kD, které patří do skupiny membránových glykoproteinů. K produkci těchto antigenů dochází především během embryonálního a fetálního vývojového stadia (Desbene et al. 2013, Hall et al. 2019, Kankanala et al. 2024). Tyto antigeny pocházejí z fetálního endodermálního epitelu, který je řízen fetálními onkogeny (Kankanala et al. 2024). Syntéza CEACAM podléhá regulaci na úrovni transkripce (Hammarström et al. 1999).

Všechny tyto proteiny jsou vysoce glykosylované a obvykle se skládají z jedné variabilní (V)-domény Ig, známé jako N-doména (s výjimkou CEACAM16, který má dvě N-domény). Liší se však počtem konstantních Ig domén a způsobem membránového ukotvení (Wu et al. 2024). N-doména se skládá ze dvou antiparalelních listů, které drží pohromadě solný můstek. Bylo prokázáno, že tato doména usnadňuje homofilní mezibuněčnou adhezi a byla identifikována jako cíl pro různé bakteriální a virové adheziny (Nagaishi et al. 2006).

Konkrétní členové skupiny CEACAM: CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7 a CEACAM8 jsou vázány na membránu prostřednictvím glykosylfosfatidylinositolové (GPI; *Glycosylphosphatidylinositol*) vazby (Wautier et al. 2022) zatímco proteiny CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM19, CEACAM20 a CEACAM21 jsou ukotveny na buněčné membráně prostřednictvím transmembránových domén. Naproti tomu CEACAM16 jakožto jediná výjimka je vylučovaná verze bez jakéhokoli membránového ukotvení (Wu et al. 2024).



Obrázek 2. Strukturální vzhled vybraných CEACAM (Tchoupa et al. 2014).

2.2.2 Fyziologická funkce CEACAM

Jedná se o onkofetální glykoproteiny, které jsou syntetizovány u plodu, od devátého týdne vývinu. Hlavními místy syntézy jsou játra, gastrointestinální trakt a slinivka břišní. Rodina proteinů CEACAM je exprimována v různých typech buněk, včetně epitelálních buněk, neutrofilů, T-buněk a dalších (Kelleher et al. 2019). Po narození jsou nízké hladiny CEACAM přítomny v tlustém střevě a mléčné žláze, zejména ve sloupcových epitelálních buňkách a pohárkových buňkách (Desbene et al. 2013, Hall et al. 2019).

Členové podskupiny CEACAM obecně zprostředkovávají mezibuněčnou adhezi prostřednictvím homofilní (CEACAM1, CEACAM5 a CEACAM6) nebo heterofilní

(CEACAM1-CEACAM5, CEACAM5-CEACAM6 a CEACAM6-CEACAM8) vazby (Nagaishi et al. 2006). Proteiny podskupiny CEACAM jsou úzce spojeny s řadou funkcí endoteliálních buněk. Mezi tyto funkce patří například zprostředkovávání mezibuněčných přenosů, regulace buněčného růstu a potlačení nádoru (adheze, proliferace, migrace buněk jak *in vivo*, tak *in vitro*) (Desbene et al. 2013, Zi-Yang et al. 2020, Hammarström et al. 1999).

Předpokládá se, že CEACAM, který je přítomen na endoluminální straně buněčné membrány zdravých buněk, funguje jako inhibitor apoptózy, čímž přispívá ke vzniku nádorů. Ačkoli je CEACAM spojován převážně s nádory trávicího traktu, literatura uvádí jeho úzkou souvislost také s karcinomy prsu, plic, vaječníků, mucinózními adenokarcinomy děložního hrdla a štítné žlázy (Kankanala et al. 2024).

Molekuly CEACAM zároveň slouží jako adhezivní molekuly pro různé druhy bakterií, včetně *Escherichia coli*, *Neisseria* spp, *Salmonella* spp a dalších, což naznačuje potenciální zapojení CEACAM do vytváření vrozené imunitní odpovědi proti mikrobům (Kelleher et al. 2019).

Bylo prokázáno, že zdravé epitelové kryty tlustého střeva mají schopnost produkovat značné množství rozpustného CEACAM, který se pravděpodobně uvolňuje prostřednictvím účinku některých endogenních fosfolipáz a následně se vylučuje stolicí, čímž je zajištěno jeho odstranění z těla (Hammarström et al. 1999).

Tabulka 1. Nomenklatura karcinoembryonálního antigenu, upraveno dle (Isacke et al. 2007).

Vybraní členové skupiny CEACAM	Starší/jiné označení
CEA	CEACAM5, CD66e
CEACAM1	CD66a, C-CAM 105, BGP, NCA-160
CEACAM3	CD66d, CGM1
CEACAM4	CGM7
CEACAM6	CD66c, NCA, NCA-90, CGM6
CEACAM7	CGM2
CEACAM8	CD66b, CGM6, CGM8, NCA-95

2.2.3 Popis proteinu CEACAM1

Tento člen skupiny CEACAM má nejširší tkáňovou distribuci ze všech členů této podskupiny. Dotyčný receptor byl nalezen nejen na epiteliálních buňkách (luminálních epiteliálních buňkách střeva), ale i na leukocytech. Exprese tohoto receptoru může být

indukována v endoteliálních nebo T-buňkách. Tyto faktory přispívají k ochraně tkání, regulaci funkce epiteliální bariéry a inhibici reakcí T-buněk (Kelleher et al. 2019, Fiori et al. 2012).

V normálních tkáních je CEACAM1 exprimován některými epiteliálními, endoteliálními, lymfoidními a myeloidními buňkami (Nagaishi et al. 2006). Byl nalezen v cytoplazmě granulocytů a myeloidních buněk, jakož i v endotelu štítné žlázy, nadledvinek, endometria, prostaty a placenty. Dále je CEACAM1 exprimován na buněčné membráně jícnových žláz, děložních žláz, pankreatických vývodů, epitelu prostaty a děložního hrdla, jaterních žlučovodů, enterocytů, hepatocytů a pohárkových buněk, se zvláště silnou expresí v absorpčních buňkách tlustého střeva a v epitelu ledvin (Prall et al. 1996).

U lidí bylo identifikováno 11 různých sestřihových variant genu CEACAM1 z jednoho genu CEACAM1. Ty jsou pojmenovány podle počtu extracelulárních konců a typu cytoplazmatického ocasu (dlouhý, L; krátký, S). Různé izoformy CEACAM1 vykazují rozdíly v počtu přítomných extracelulárních domén podobných imunoglobulinům Ig-C2 (Nagaishi et al. 2006, Fiori et al. 2012).

Izoforma „L“ zahrnuje 70 aminokyselin (71 u člověka) v cytoplazmě, včetně několika serinových, treoninových a tyrosinových zbytků. Tyto zbytky mohou být cílem fosforylace a mohou se podílet na přenosu signálu a interakcích protein-protein. Naopak izoformy „S“ kódují pouze 10 cytoplazmatických zbytků bez fosforylačních míst. Exprese obou izoformem probíhá současně ve většině tkání, které exprimují CEACAM1, přičemž poměr mezi oběma izoformami určuje výsledek signalizace. Zvláště důležité je, že dva tyrozinové zbytky v dlouhé cytoplazmatické doméně tvoří funkční inhibiční motiv na bázi imunoreceptorů (ITIM; *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*). Zdá se, že tento motiv je základem inhibiční aktivity genu CEACAM1 (Kuespert et al. 2006)

Osm izoformem je ukotveno prostřednictvím jediné hydrofobní membránově se šířící oblasti, za níž následuje buď krátký, nebo dlouhý cytoplazmatický ocas, zatímco ostatní varianty CEACAM1 postrádají transmembránovou doménu, a jsou proto vylučovány (Nagaishi et al. 2006).

Protein CEACAM1 je aktivační povrchová molekula na T-buňkách a NK-buňkách, na kterých pravděpodobně působí inhibičně prostřednictvím homofilních interakcí. CEACAM1 je v nízkých hladinách exprimován na klidových CD4+ T-buňkách, ale ne na CD8+ nebo + T-buňkách, jako jsou intraepiteliální lymfocyty (IEL; *Intraepithelial lymphocytes*) (Nagaishi et al. 2006).

Po aktivaci je CEACAM1 rychle a silně regulován na všech třídách lidských T-buněk. T- buňky exprimují CEACAM1 *in vivo* v lidských tkáních lamina propria tenkého střeva u celiakie a tlustého střeva u zánětlivých střevních onemocnění, což naznačuje funkční roli CEACAM1 u imunitně zprostředkovaných střevních onemocnění. Důležité je, že lidské T- buňky IEL a T-buňky periferní krve neexprimují po stimulaci žádný jiný člen rodiny CEACAM než CEACAM1, což naznačuje jedinečnou úlohu CEACAM1 ve funkci T-buňky (Nagaishi et al. 2006).

Molekula CEACAM1 vykazuje mezibuněčné homofilní interakce i heterofilní vazbu na CEACAM5 exprimovaný na cílových buňkách (Fiori et al. 2012).

2.2.3.1 Protein CEACAM1 jako biomarker v klinické praxi

U některých nádorových buněčných linií obnovení exprese CEACAM1 ruší jejich onkogenicitu *in vivo*, a proto je tato adhezní molekula považována za nádorový supresor (Fiori et al. 2012).

Protein CEACAM1 je biomarkerem u melanomu, nemalobuněčného karcinomu plic a adenokarcinomu pankreatu (PDAC; *Pancreatic ductal adenocarcinoma*) a jeho zvýšená exprese je spojena se závažností onemocnění (Thomas et al. 2023). Difuzní a cytoplazmatická exprese CEACAM1 může zahrnovat časná stadium hepatocelulárního karcinomu (HCC; *Hepatocellular carcinoma*) a ztráta exprese CEACAM1 indikuje progresi nádoru (Wu et al. 2016).

Biomarker CEACAM1 hraje dvojí roli u různých nádorových onemocnění, a rozporuplný účinek může záviset na poměru izoform CD66a-L a CD66a-S. Inhibice CEACAM1 u lidských buněčných linií B-ALL snižuje buněčnou proliferaci a zvyšuje procento buněčné apoptózy a poměr CD66a-L k CD66a-S u leukemických B-buněk je mnohem vyšší než u granulocytů. Kromě toho změna poměru L:S pomocí umlčení a nadměrné exprese izoformy L v buněčných liniích B-buněčné akutní lymfoblastické leukémie potvrdila, že vysoký poměr L:S CEACAM1 v leukemických B-buňkách podporuje proliferaci a inhibuje apoptózu (Zhao et al. 2015).

2.2.4 Popis proteinu CEACAM5

Protein CEACAM5, dříve známý jako karcinoembryonální antigen, je glykoprotein patřící do imunoglobulinové superrodiny. Exprimuje se za fyziologických podmínek na povrchu epitelových buněk trávicího traktu, zejména během embryogeneze. U dospělých jedinců je jeho exprese omezena, avšak v nádorových buňkách – především v adenokarcinomech kolorekta, pankreatu, plic a žaludku – dochází k jeho nadměrné reexpresi (Hammarström, 1999).

CEACAM5 je transmembránový protein, který se skládá z jedné koncové variabilní N-domény a šesti Ig domén podobných C2 a jeho GPI vazba zajišťuje membránové ukotvení (Thomas et al. 2023).

Molekula CEACAM5 běžně funguje jako adhezní molekula, ale má také úlohu v regulaci diferenciaci, imunitní modulaci a inhibici anoikis (Blat et al. 2014) (Mizobata et al.) (Thomas et al. 2023). Jeho nadměrná exprese může změnit polaritu buněk a normální strukturu tkáně, zpomalit diferenciaci a zrání buněk, a nakonec vést ke vzniku nádoru (Zhang et al. 2020).

Bylo prokázáno, že CEACAM5 je jediným členem CEACAM, který interaguje s CD1d prostřednictvím domény B3. Jeho doména N (rozpoznávaná doménou B9) je nezbytná pro vazbu CD8a. Odstranění glykosylovaných zbytků N-domény snižuje rozpoznávání B9, vazebnou afinitu CD8a a aktivaci lymfoidní kinázy. Konformační změny v glykosylačním místě CEACAM5 jsou tedy kritické pro jeho interakci s CD8a. CEACAM5 aktivované CD8 T- buňky získávají schopnost potlačovat proliferaci CD4 T-buněk *in vitro* v přítomnosti interleukinu (IL 15 nebo IL-7) (Roda et al. 2014).

Adhezivní vlastnosti CEACAM5 umožňují hematopoetickým kmenovým buňkám (HSC; *Hematopoietic stem cell*) sebeobnovu v reakci na signály z niky, které jsou často v krátkém dosahu. CEACAM5 tedy může hrát zásadní roli buď v ukotvení dlouhodobé hematopoetické kmenové buňky (LT-HSC; *Long-term hematopoietic stem cell*) v nice kostní dřeně, nebo ve zprostředkování signální dráhy, která zajišťuje udržení populace kmenových buněk v hypoxickém mikroprostředí. CEACAM5 buňky se tak lépe udržují a dále diferencují *in vivo* (Ma et al. 2023).

Genová exprese CEACAM5 je řízena komplexní kombinací transkripčních faktorů, epigenetických mechanismů a buněčného mikroprostředí. Promotor CEACAM5 obsahuje vazebná místa specificky určená pro transkripční faktory, jako například Sp1, NF- κ B, C/EBP a HNF4 α , které regulují jeho aktivitu v závislosti na buněčném typu a stavu diferenciaci (Thompson et al. 2000).

Velkou roli hraje také epigenetická regulace, zejména metylace cytosin-fosfát-guanin (CpG; *Cytosine-Phosphate-Guanine*) oblastí v promotoru CEACAM5, která inhibuje jeho expresi v normálních tkáních. Hypometylace těchto oblastí byla prokázána u různých karcinomů a vede ke zvýšené expresi antigenu v nádorových buňkách (Park et al. 2012).

Další významný faktor představuje prostředí nádoru. Inflamatorní cytokiny, jako TNF- α nebo IL-6, mohou indukovat expresi CEACAM5 prostřednictvím aktivace transkripčních drah, což naznačuje, že zánětlivé procesy v nádorovém prostředí mohou hrát roli při jeho zvýšené expresi (Kim et al. 2006). Exprese CEACAM5 je navíc ovlivněna i diferenciací buněk – například vyšší exprese byla zaznamenána u dobře diferencovaných adenokarcinomů ve srovnání s méně diferencovanými formami (Blumenthal et al. 2007).

Na posttranskripční úrovni může být exprese CEACAM5 regulována i mikroRNA. Například některé miR-135 a miR-200 rodiny mohou cílit na transkripty CEACAM5 a ovlivnit jejich stabilitu či translaci (Chen et al. 2015).

2.2.4.1 Protein CEACAM5 jako biomarker v klinické praxi

Biomarker CEACAM5 má významnou klinickou roli jako nádorový marker u několika nádorů včetně gastrointestinálních a respiračních malignit. Vzhledem k nízké senzitivitě a specificitě je však jeho samotná prediktivní hodnota stále nejasná (Thomas et al. 2023). Je to proto, že CEACAM5 má pouze 70 % senzitivitu a specificitu. Snížením počtu CD8⁺ a poměru CD4/CD8, lze zvýšit senzitivitu a specificitu CEACAM5 až na 100 % pro prognózu CRC. (Mutalib et al. 2010).

Exprese CEACAM5 je vyšší v epitelu a submukóze u těžkých astmatiků. To má potenciální význam pro změněný mikrobiom dýchacích cest a tvorbu biofilmu u těžkého astmatu. Z tohoto důvodu by mohla být prospěšná léčba cílená na CEACAM5 (Tanner et al. 2018).

Lidské HSC lze rozlišit podle exprese buněčné adhezivní molekuly CEA (CEACAM5 neboli CD66e), která slouží jako marker a regulátor funkce HSC. Tyto výsledky společně naznačily, že CEACAM5 je marker, který obohacuje funkční lidské hematopoetické kmenové buňky schopné dlouhodobého multilineárního přijetí. Tím se stává CEACAM5 potenciálním povrchovým markerem HSC pomocí HSC z lidské pupečnickové krve (Ma et al. 2023).

V klinické praxi je CEACAM5 hojně využíván jako nádorový marker, zejména v rámci imunohistochemické detekce v tkáňových vzorcích. Jeho detekce pomocí imunohistochemie se uplatňuje při diferenciální diagnostice adenokarcinomů, zejména při určování původu metastatických ložisek nejasné etiologie. Pozitivní imunohistochemická reakce na CEACAM5 například ve vzorcích z jater nebo plic může indikovat kolorektální původ nádoru (Yan et al. 2014). Díky své selektivní expresi v nádorové tkáni a absenci v některých zdravých tkáních je CEACAM5 rovněž perspektivním cílem pro vývoj cílené terapie, včetně terapeutických monoklonálních protilátek (Thompson et al. 2010).

2.2.4.2 Exprese CEACAM5 u gastrických buněk

Molekula CEACAM5 je nadměrně exprimována přibližně u 90 % nádorů trávicího traktu, tlustého střeva a slinivky břišní (Zhou et al. 2015). CEACAM5 má rozdílné expresní vzorce v nenádorových a nádorových lézích žaludku. Expresní vzorce CEACAM5 jsou spojeny s progresí nádoru. Membránové barvení CEACAM5 je markerem premalignity v žaludečních lézích. Cytoplazmatický CEACAM5 zvyšuje invazivitu a migraci nádoru. Díky tomuto je důležitým markerem při hodnocení progresivního a pokročilého karcinomu žaludku (Liu et al. 2014).

Ve patologickém kontextu dochází k významné alteraci exprese CEACAM5, zejména v souvislosti s gastrickým adenokarcinomem, který představuje jednu z nejčastějších malignit trávicího traktu. CEACAM5 je v těchto případech často nadměrně exprimován a může být lokalizován nejen na apikálním, ale i na laterálním nebo dokonce bazolaterálním povrchu nádorových buněk, což naznačuje ztrátu polaritu a diferenciaci (Tanaka et al. 2000).

Studie ukazují, že CEACAM5 může interagovat s integriny (např. $\alpha 5 \beta 1$) a aktivovat signální dráhy zahrnující Src kinázy, které podporují buněčný pohyb a metastázování (Ordonez et al. 2013). V experimentálních modelech gastrických nádorů bylo rovněž prokázáno, že inhibice CEACAM5 pomocí specifických protilátek nebo siRNA vede ke snížení nádorové proliferace a invazivity (Wang et al. 2011).

Z diagnostického hlediska je CEACAM5 využíván jako imunohistochemický marker při detekci a klasifikaci gastrických nádorů. Pozitivní imunohistochemická reakce na CEACAM5 se objevuje zejména v intestinálním typu adenokarcinomu žaludku dle klasifikace Lauréna, zatímco difuzní typ vykazuje nižší expresi (Yan et al. 2014). Tato odlišnost má význam jak pro diagnostiku, tak pro predikci biologického chování nádoru.

Vzhledem k jeho selektivní expresi v nádorových buňkách a minimální expresi ve zdravé dospělé gastrické sliznici je CEACAM5 perspektivním terapeutickým cílem. V preklinických studiích se testují monoklonální protilátky nebo konjugáty protilátek s cytotoxickými látkami, které selektivně cílí CEACAM5 exprimující buňky (Thompson et al. 2010).

Expresce CEACAM5 lze pozorovat u izolovaných buněčných linií kolorektálního karcinomu metodou *in vitro*, především z myši (NCI-H716 nebo NCI-H498) či buněčných linií karcinomu žaludku pacientů. Příkladem těchto lidských linií je dobře diferencovaná linie NCI-N87, MKN-45 či MKN-74 (Takaishi et al. 2009). Na rozdíl od kolorektálních karcinomů je kultivace

žaludečních karcinomů velmi obtížná (Gazdar et al. 1996). Tato buněčná linie se běžně využívá například pro výzkumy propustnosti léků či toxinů žaludeční stěnou (Lemieux et al. 2011).

Biomarker CEACAM5 je v buňkách N87 vysokoprodukovaný a exprimuje se především na jejich buněčném povrchu, což z této linie buněk činí vhodný model pro testování imunoterapeutických přístupů, které tento antigen cílí (Shirasu et al. 2016). V porovnání s jinými gastrickými liniemi (např. AGS nebo MKN45) patří N87 k těm s nejvyšší povrchovou expresí CEACAM5, což bylo potvrzeno jak metodami průtokové cytometrie, tak imunofluorescenční mikroskopii (Blumenthal et al. 2017).

Přítomnost CEACAM5 u N87 není pouze strukturální, ale hraje i funkční roli v rámci adhezivního a signálního chování buněk. CEACAM5 může ovlivňovat buněčnou migraci, proliferaci a odolnost vůči apoptóze skrze aktivaci „downstream“ drah (Ordonez et al. 2013). Tyto vlastnosti činí N87 výhodným systémem i pro testování anti-CEA terapeutik, například monoklonálních protilátek nebo protilátka – lék konjugátů (ADC; *Antibody-drug conjugates*) (Tabrizi et al. 2022).

Z hlediska imunohistochemie lze CEACAM5 v buňkách N87 detekovat silnou cytoplazmatickou i membránovou reaktivitou, což odpovídá jeho nativnímu rozložení ve tkáních lidského žaludku s adenokarcinomem intestinálního typu. Tato pozitivita potvrzuje využitelnost N87 v histopatologických studiích, kde model napodobuje expresní profil *in vivo* nádorových buněk (Yan et al. 2014).

2.2.5 Popis proteinu CEACAM6

Protein CEACAM6 je kotvený, silně glykosylovaný glykosylfosfatidylinositol patřící do rodiny karcinoembryonálních antigenů, který má dvě konstantní domény podobné Ig a jednu variabilní doménu podobnou Ig. Tato glykoproteinová molekula je lokalizována na povrchu buněk a hraje roli především v mezibuněčné adhezi, buněčné signalizaci, imunitní modulaci a onkogenezi (Hammarström 1999). Podílí se na homotypové a heterotypové adhezi, přispívá k signalizaci zprostředkované Ca^{2+} a podílí se na indukci apoptózy (Kiyokawa et al. 2014).

Exprese CEACAM6 je za fyziologických podmínek exprimován ve fetální tkáni, zejména v trávicím traktu a plicích, zatímco v dospělých tkáních bývá jeho exprese omezená. Exprese úzce souvisí s určitým souborem genetických abnormalit, i když se neomezuje pouze na jednu konkrétní (Kiyokawa et al. 2014). Zvýšená exprese CEACAM6 je pozorována u řady solidních nádorů, například adenokarcinomu slinivky břišní, kolorektálního karcinomu, karcinomu prsu a plic (Blumenthal et al. 2007, Ordonez 2003). V těchto případech je CEACAM6 spojován

s nádorovou progresí, inhibicí apoptózy, epiteliálně-mezenchymálním přechodem a metastatickým potenciálem.

Člen CEACAM6 podskupiny CEACAM je exprimován především v tlustém střevě podobně jako ostatní členové této skupiny, játrech, žaludku, žlučníku, kůži a jazyku. Kromě toho je exprimován ve dlaždicovém epitelu jazyka, jícnu a děložního čípku. CEACAM6 je také prominentní ve slizničních epitelích podčelistní slinné a přední jazykové žlázy a také v myeloidních buňkách prostaty a kostní dřeni (Prall et al. 1996).

Další exprese CD66c neboli CEACAM6 je fyziologicky v řadě hematopoézy pozorována pouze u granulocytů a jejich prekurzorů (Kiyokawa et al. 2014).

2.2.5.1 Protein CEACAM6 jako biomarker v klinické praxi

Biomarker CEACAM6 je vysoce exprimován u hyperplastických polypů a adenomů tlustého střeva, karcinomu prsu, karcinomu pankreatu, mucinózního karcinomu vaječníků, karcinomu žaludku a adenokarcinomu plic (Thomas et al. 2023).

Exprese CEACAM6 je významně vyšší u karcinomů tlustého střeva než v přilehlých fyziologických tkáních tlustého střeva a jeho hladina přímo odpovídá stádiu karcinomu (Gemei et al. 2013). Exprese CEACAM1 a CEACAM7 je u kolorektálního karcinomu snižená, zatímco exprese CEACAM6 je u CRC ve srovnání s normální sliznicí zvýšená (Nataraj et al. 2016). Protein CEACAM6 je novým biomarkerem souvisejícím s nádory kmenových buněk u kolorektálních karcinomů, protože jeho umlčení zastavuje růst nádoru *in vivo* (Nataraj et al. 2016).

Mechanisticky CEACAM6 podporuje nádorovou invazivitu skrze inhibici buněčného kontaktu, změnu cytoskeletu a zvýšení interakce s extracelulární matrix prostřednictvím aktivace signálních drah (Duxbury et al. 2004). Dále byla prokázána souvislost mezi vyšší expresí CEACAM6 a rezistencí k chemoterapii u některých typů nádorů, což podtrhuje jeho význam jako prognostického a prediktivního biomarkeru (Chung et al. 2011).

Ačkoli samotná exprese CEACAM6 není přímo spojena s prognózou, genetické abnormality doprovázející expresi CEACAM6 jsou u hematologických onemocnění, například u akutní lymfoblastické leukemie s prekurzory B-buněk (BCP-ALL; *B precursor acute lymphoblastic leukaemia*), důležitými prognostickými faktory, a proto je třeba pečlivě zkoumat genetické nálezy s přítomností exprese CD66c neboli CEACAM6 (Kiyokawa et al. 2014). Díky

tomuto je u BCP-ALL znám jako nejčastěji pozorovaný aberantní myeloidní antigen (Kiyokawa et al. 2014).

Z klinického hlediska je CEACAM6 zkoumán jako cílová molekula pro terapeutické intervence, např. pomocí monoklonálních protilátek, RNA interference nebo T-buněk s chimérickým antigenním receptorem. Jeho selektivní exprese v nádorové tkáni a minimální výskyt ve zdravých buňkách z něj činí slibný terč pro cílenou terapii (Blumenthal et al. 2007).

2.2.6 Další faktory ovlivňující hladinu CEACAM

Hladina CEA se může zvýšit u řady patologií (Simon et al. 2016). Za fyziologických podmínek je hladina CEA v séru velmi nízká, obvykle do 3 µg/l (Duffy 2001). Významně zvýšené hodnoty CEA se vyskytují u řady malignit, především u CRC, ale také u karcinomu pankreatu, žaludku, plic, prsu a vaječníků (Locker et al. 2006). U těchto onemocnění může hladina přesáhnout 10–20 µg/l, zvláště při přítomnosti metastáz, například do jater.

Zvýšené koncentrace CEA ale nejsou výhradně specifické pro nádorová onemocnění. Také nemaligní onemocnění, zejména chronické zánětlivé stavy, jako jsou ulcerózní kolitida, Crohnova choroba, chronická hepatitida, cirhóza nebo pankreatitida, mohou vést k mírnému zvýšení sérových hladin CEA, často do 10 µg/l (Becerra et al. 2004). U těchto stavů bývá exprese CEA zvýšena v důsledku zvýšené regenerace epitelu nebo aktivace zánětlivých drah.

Dalším důležitým faktorem je kouření, které je spojeno s trvale vyšší hladinou CEA. Aktivní kuřáci mohou vykazovat hodnoty až dvojnásobné oproti nekuřákům (Carpelan-Holmstrom et al. 2002). Tento efekt je připisován chronickému podráždění dýchacích cest, které vede k expresi CEA v epitelových buňkách.

Hladina CEA může být ovlivněna i věkem, přičemž starší pacienti mohou mít mírně vyšší hodnoty. Dále hraje roli i přesnost laboratorní metody, přičemž rozdílné imunochemické techniky mohou vykazovat variabilitu výsledků (Duffy 2001). Vzácně mohou falešně negativní nebo pozitivní výsledky být způsobeny navíc technickými faktory, jako je hemolýza vzorku, lipémie nebo kontaminace.

Z terapeutického hlediska hladina CEA klesá po úspěšné chirurgické resekci nádoru, a její následné zvýšení může sloužit jako indikátor relapsu. Naopak během chemoterapie může dojít k přechodnému zvýšení CEA v důsledku tumor lysis nebo zánětlivé odpovědi na léčbu (Locker et al. 2006).

Tabulka 2. Stavy spojené se zvýšenou hladinou CEACAM, upraveno dle (Hall et al. 2019).

Nezhoubné	Zhoubné
<ul style="list-style-type: none"> • Kouření 	Nádory spojené s vysokou expresí CEA
<ul style="list-style-type: none"> • Infekce 	<ul style="list-style-type: none"> • Kolorektální
<ul style="list-style-type: none"> • Peptidické vředy 	<ul style="list-style-type: none"> • Ovariální
<ul style="list-style-type: none"> • Zánětlivé onemocnění střev 	<ul style="list-style-type: none"> • Cervikální
<ul style="list-style-type: none"> • Pankreatitida 	<ul style="list-style-type: none"> • Plic
<ul style="list-style-type: none"> • Hypotyreóza 	<ul style="list-style-type: none"> • Jícnový
<ul style="list-style-type: none"> • Cirhóza jater 	<ul style="list-style-type: none"> • Žaludeční
<ul style="list-style-type: none"> • Hepatitida 	<ul style="list-style-type: none"> • Tenkého střeva
<ul style="list-style-type: none"> • Benigní stavy prsou 	<ul style="list-style-type: none"> • Hepatobiliární
<ul style="list-style-type: none"> • Jiné benigní nádory spojeny se zvýšenou hladinou CEA 	<ul style="list-style-type: none"> • Slinivky břišní
	<ul style="list-style-type: none"> • Prsu
	<ul style="list-style-type: none"> • Medulární
	Jiné nádory exprimující CEA
	<ul style="list-style-type: none"> • Choriokarcinom
	<ul style="list-style-type: none"> • Osteosarkom
	<ul style="list-style-type: none"> • Retinoblastom
	<ul style="list-style-type: none"> • Hepatom

2.3 Detekce CEA

Karcinoembryonální antigen je nádorový biomarker uplatňující se především u kolorektálního karcinomu a některých dalších onemocnění. Tento protein se využívá pro screening nádorů, predikci výsledku a potenciální následnou léčbu. (Zhang et al. 2020).

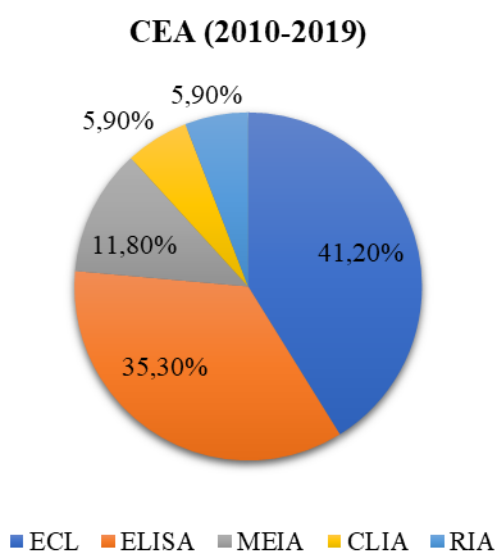
Průměrná koncentrace CEA v séru u zdravého člověka je obvykle do 3–5 µg/l (diskriminační hranice), u kuřáku je tato hranice vyšší. Hladina CEA v séru nad 10 µg/l indikuje možnou přítomnost výskytu rakovinných buněk či jiných onemocnění organismu (Han et al. 2017). Hodnoty přesahující 20 µg/l bývají indikátorem vzdálených metastáz, zejména v játrech (Locker et al. 2006). Z toho důvodu je důležitá opatrnost při interpretaci hraničních hodnot, zejména pokud se CEA používá jako screeningový test. Vzhledem k zásadnímu klinickému významu CEA, složité struktuře a extrémně nízké koncentraci v normálním lidském séru zůstává přesné stanovení tohoto proteinu hlavním předmětem lékařské analýzy (Sun et al. 2025).

Pro stanovení těchto koncentrací proteinů je zapotřebí využít citlivější metody. Využívají se především metody založené na imunologii nebo méně běžné technologie založené na hmotnostní spektrometrii (MS; *Mass spektrometry*), které se ale prozatím zaměřují především na detekci malých molekul jako například vitaminů či aminokyselin (Sun et al. 2025).

Tabulka 3. Porovnání imunologických metod s hm. spektrometrií, upraveno dle (Sun et al. 2025).

Vlastnosti	Imunoanalýza	Hmotnostní spektrometrie
Princip	Založeno na specifické vazbě protilátek na antigeny	Založeno na analýze poměru hmotnosti a náboje iontů
Citlivost	Obecně vysoká, lze detekovat látky na úrovni pikogramů (pg/ml)	Extrémně vysoká citlivost, lze detekovat látky na úrovni femtogramů (fg/ml)
Specifičnost	Vysoká specifičnost, zejména u optimalizovaných protilátek pro cílové molekuly	Extrémně vysoká specifičnost, schopná rozlišit strukturně podobné molekuly
Složitost provozu	Relativně jednoduchá, vysoce automatizovaná, vhodná pro rozsáhlý screening	Složitější, vyžaduje specializovaný personál, drahé přístroje a údržbu
Propustnost	Vysoká, vhodná pro rychlý screening velkého množství vzorků	Relativně nižší propustnost, používá se především pro podrobnou analýzu komplexních vzorků
Časová účinnost	Rychlá (obvykle dokončena do 1 h), vhodná pro rychlou klinickou diagnostiku	Relativně dlouhá (několik hodin až den), zejména při zdlouhavé přípravě vzorků
Detekční rozsah	Omezený na molekuly, pro které lze vyvinout vhodné protilátky	Široký rozsah, použitelný pro téměř všechny typy molekul, včetně malých molekul, velkých molekul a izotopově značených sloučenin
Náklady	Relativně nízké, zejména pokud jde o náklady na činidla a vybavení	Drahé, s vysokými náklady na vybavení, činidla a údržbu
Omezení	Lze detekovat pouze známé cílové látky, mohou být ovlivněny zkříženou reaktivitou protilátek	Vysoké nároky na přístroje, složitá příprava vzorků a vysoké náklady na údržbu přístrojů
Klinické použití	Široké uplatnění v klinické diagnostice, např. biomarkery rakoviny, hormony a imunologické markery	Používají se hlavně ve výzkumných oblastech, ale v určitých případech jsou použitelné i ve vysoce přesné klinické diagnostice.

Nejčastěji používanou imunologickou metodou pro detekci CEA v séru v moderní době zastává elektrochemiluminiscence (ECL; *Electrochemical luminescence*) (Wei et al. 2022), následována enzymovou imuno-sorbční analýzou (ELISA; *Enzyme-linked immuno-sorbent assay*) (Joshi et al. 2022), mikročasticová enzymová imunoanalýza (MEIA; *Microparticle enzyme immunoassay*) (Filiberti et al. 2013) a chemiluminiscenční imunoanalýza (CLIA; *Chemiluminescent immunoassay*) (Serdarevic et al. 2018). Soupravy využívající metodu ELISA vyvíjelo několik společností. Zatímco ECL obvykle poskytovala společnost Roche Diagnostics. Metodu CLIA preferovala diagnostická divize společnosti Bayer HealthCare LLC (Jeong et al. 2020).



Graf 1. Frekvencovanost metod využívaných pro detekci biomarkerů a hormonů, upraveno dle (Jeong et al. 2020).

Rozdíly v principech detekce různých imunologických metod, přístrojích, reagentech, epitopech protilátek a jejich specifitě stále často vedou k nekonzistentním výsledkům imunoanalýzy CEA. Dosažení úplné koordinace v této oblasti zůstává prozatím složitým procesem, z důvodu absence referenčního postupu měření (RMP; *Reference measurement procedure*) pro CEA a nedostatek vysoce kvalitních referenčních materiálů vedli ke ztížení procesu standardizace metod detekce CEA (Sun et al. 2025). Další metodou sloužící k detekci CEA je například imunohistochemické barvení preparátů využívané především v klinické praxi.

2.3.1 Elektrochemiluminiscenční imunoanalýza

Elektrochemiluminiscence, je druh chemiluminiscenčního jevu iniciovaného elektrochemickou reakcí probíhající v blízkosti elektrody. Zdědila po chemiluminiscenční

metodě vysokou citlivost a po elektrochemii časovou a prostorovou kontrolovatelnost. Její výraznou výhodou je také téměř nulový signál pozadí ve srovnání s fotoluminiscencí, díky tomu se stává měření přesnějším a jednodušším (Wang et al. 2023).

V dnešní době se ECL stala poměrně výkonnou analytickou technikou, která se všeobecně používá v klinické diagnostice, analýze bezpečnosti potravin a monitorování životního prostředí (Hu et al. 2010).

Mechanismy ECL zahrnují dvě hlavní třídy, a to anihilační a koreaktantové cesty, z nichž koreaktantová ECL s úzkým potenciálním oknem a silnou odezvou signálu přenáší jev ECL ze základního výzkumu do praktických aplikací. V reakčním procesu této metody hrají hlavní roli luminofory ECL, které reagují s různými koreaktanty nebo jejich meziprodukty a vytvářejí emisi ECL (Wang et al. 2023).

Zásadním průlomem ve vývoji klasické ECL je imunoanalýza ECL, která kombinuje specifickou imunitní reakci s vlastními vlastnostmi ECL, což umožňuje citlivou a specifickou detekci biomarkerů s rychlým postupem analýzy a jednoduchým zařízením. Proteinové biomarkery jako podkategorie biomarkerů se staly nejčastějšími cílovými analyty v imunoanalýze ECL (Wang et al. 2023).

Pro detekci proteinových biomarkerů, včetně enzymů, hormonů a dalších proteinů, byly vyvinuty různé biosenzory, jako jsou bezznačkové imunosenzory, sendvičové imunosenzory, kompetitivní imunosenzory, a dokonce i aptasenzory, které využívají aptamery (krátké jednořetězcové molekuly DNA nebo RNA) jakožto rozpoznávací prvky (Wang et al. 2023).

Mezi nejčastěji studované biomarkery nádorů související s proteiny v biologických testech ECL patří CEA, karbohydrátový antigen (CA; *Carbohydrate antigen*), alfa fetoprotein, prostatický specifický antigen (PSA; *Prostate-specific antigen*) a mucin 1 (MUC1) (Wang et al. 2023). Tato metoda je prozatím ta nejcitlivější metoda, běžně využívaná v laboratořích, která je zároveň časově nenáročná. Nevýhodou této metody detekce CEA je její finanční náročnost. Kliničtí lékaři považují elektrochemiluminiscenci společně s chemiluminiscencí za hlavní techniky detekce CEA (Sun et al. 2025).

V současné době se věnuje velké úsilí vývoji vysoce citlivých ECL imunosenzorů pro detekci CEA. Například byl vytvořen ratiometrický ECL imunosenzor závislý na koreaktantech s použitím kvantových teček ze sulfidu kadmnatého (CdS QD; *Cadmium sulfide quantum dots*) jako katodického luminoforu a luminolu jako anodického luminoforu

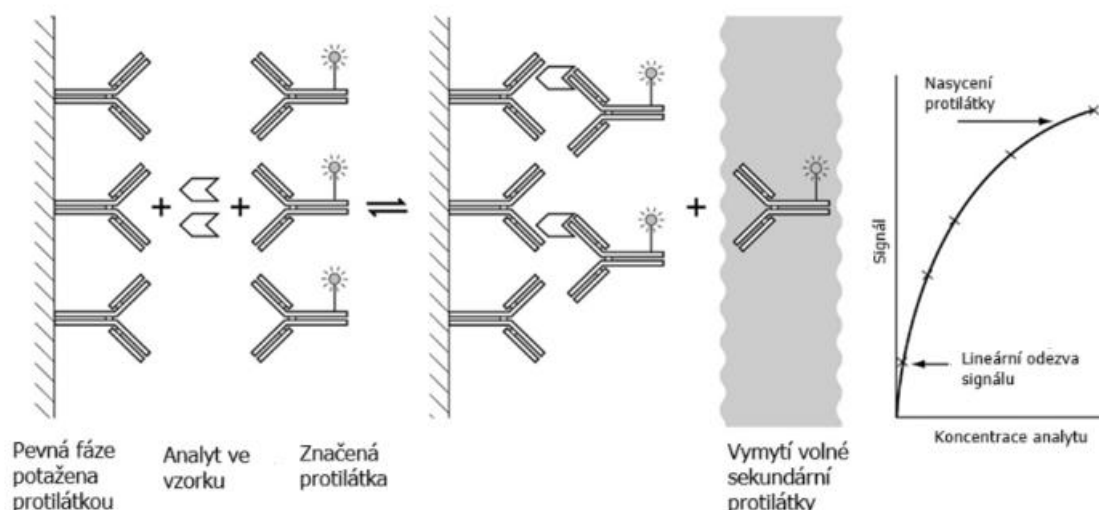
k detekci CEA s detekčním limitem 0,62 pg/ml. Zhang a spol. použili CdSe QDs jako indikátor ECL k vývoji jednomolekulárního imunosenzoru, který dokázal detekovat téměř 8 molekul CEA ve vzorku séra (20 µl) (Wang et al. 2023).

2.3.2 Enzymová imuno-sorbční imunoanalýza

Enzymové imunoanalýzy (EIA; *Enzyme immunoassay*) uplatňují katalytické vlastnosti enzymů k detekci a kvantifikaci imunologických reakcí. Enzymová imuno-sorbční analýza je heterogenní technika (primární protilátka je navázána na pevnou fázi) EIA používaná v klinických analýzách (Alhajj et al. 2023). Podle mnohých laboratoří je ELISA stále zlatým standardem pro detekci velkého množství proteinů ve fyziologických vzorcích, a tak stále dominuje laboratorní praxi (Wu et al. 2015, Sun et al. 2025).

Tento typ analýzy spočívá v tom, že jedna ze složek reakce je nespecificky adsorbována nebo kovalentně vázána na povrch pevné nerozpustné fáze, jako je mikrotitrační jamka, magnetická částice nebo plastová kulička. Toto navázání častokrát zvětšuje povrch pro navázání a zároveň usnadňuje oddělení navázaných a volně značených reaktantů (Alhajj et al. 2023). Tato metoda má více možností provedení a zle ji dále dělit na kompetitivní či nekompetitivní.

V klasickém přístupu k použití techniky ELISA se přesně daná část vzorku nebo kalibrátoru obsahujícího antigen (Ag), který má být kvantifikován-, přidá k protilátce (Ab) navázané na pevné fázi a nechá se s ní vytvořit primární komplex. Po vícečetném promytí se přidá protilátka značená enzymem a vytvoří „sendvičový komplex“ pevné fáze Ab-Ag-Ab. Nenavázaná protilátka se poté promyje a přidá se enzymový substrát. Množství produktu, který vznikl je úměrné koncentraci antigenu ve vzorku (Alhajj et al. 2023). Tento postup provedení dané metody se obecně označuje jako sendvičová nekompetitivní přímá ELISA.



Obrázek 3. Schéma přímé sendvičové metody ELISA (Wild et al. 2013).

V tradičních metodách ELISA se k vizualizaci vazby cílového proteinu na specifický rozpoznávací prvek používají kolorimetrické nebo fluorescenční signály (Wu et al. 2015).

Tradiční kolorimetrický test ELISA generuje signál přeměnou enzymového substrátu na barevnou molekulu a intenzita zbarvení roztoku se pak kvantifikuje měřením absorbance pomocí čtečky mikrotitračních destiček. Přestože rozlišení mezi nezabarveným a zabarveným roztokem může být realizováno pouhým okem, je toho obtížné dosáhnout při měření nízkých koncentrací biomarkerů. Ty jsou stěžejním bodem při prognóze některých onemocnění, a proto je kontrola pouhým okem nevhodná pro ultrasenzitivní detekci (Wu et al. 2015).

Nedávno se ukázalo, že použití nanomateriálů v imunoanalýze je velmi slibné pro ultra citlivou detekci proteinů. Například konjugáty zlatých nanočástic/biomolekul našly uplatnění jako amplifikační značky v široké škále bioanalytických aplikací (Liu et al. 2010). Konjugáty zlatých nanočástic mohou být použity jako nosič pro četné biotinylované protilátky proti CEA. Molekuly streptavidinu-křenové peroxidázy (HRP; *Horseradish peroxidase*) jsou poté imobilizovány na povrchu zlatých nanočástic prostřednictvím biotin-avidinového můstku. Při použití této strategie může každá zlatá nanočástice akumulovat přibližně 12 molekul HRP. Kolorimetrické enzymové imunoanalýzy založené na takto navrženém komplexu zlatých nanočástic mohou nabídnout pozoruhodně zvýšenou citlivost pro měření CEA (Liu et al. 2010). Tato metoda má více možností provedení, je jednoduchá a finančně nenáročná, proto se využívá nejčastěji.

Nevýhodami této metody může být problematická stabilita činidel, protože přírodní enzymy používané jako luminofory jsou velmi citlivé na experimentální podmínky. Dále enzymová

technologie bývá oproti biosenzorům finančně náročnější. Za třetí, celková doba trvání testu může být dlouhá. Kromě toho metoda vyžaduje přesnou obsluhu a důkladné zaškolení personálu (Sun et al. 2025). Výsledkem je, že i přestože metoda ELISA zůstává ve výzkumných laboratořích hojně rozšířená, v klinické praxi ji z velké části nahradily rychlejší detekční metody (Chen et al. 2012).

2.3.3 Mikročasticová enzymová imunoanalýza

Mikročasticová enzymová imunoanalýza představuje specifický typ heterogenní enzymové imunoanalýzy, která využívá paramagnetické mikročastice jako pevnou fázi pro zachycení analytu. Tyto částice jsou pokryté specifickými protilátkami nebo antigeny a díky svému vysokému povrchu ku objemu umožňují rychlé a efektivní vazby mezi analytem a protilátkou (Wild et al. 2013). MEIA patří mezi automatizované metody vhodné pro rutinní laboratorní diagnostiku a je často využívána v klinické chemii, imunologii i v mikrobiologii

Princip metody spočívá v navázání cílové molekuly (např. hormonu, antigenu nebo protilátky) na mikročastici s imobilizovanou protilátkou. Po inkubaci a promytí nespecificky vázaných složek se přidá enzymem značený konjugát, který se váže na druhé místo cílového analytu. Přidáním vhodného substrátu dochází k enzymatické reakci, jejíž produkt je detekovatelný spektrofotometricky nebo chemiluminiscenčně (Josko et al. 2012).

Analýza MEIA nachází široké uplatnění v detekci hormonů (např. TSH, hCG), virových antigenů, terapeutických léčiv či nádorových markerů. Díky vysoké citlivosti, specificitě a možnosti plné automatizace se stala standardní metodou v mnoha laboratořích. Příkladem komerčního využití MEIA je přístroj AxSYM od společnosti Abbott, který umožňuje paralelní analýzu velkého počtu vzorků s minimálním zásahem obsluhy (Kricka 2000). Jednou z nevýhod může být interferenční vazba heterofilních protilátek nebo reaktivity složek vzorku, což může způsobit falešně pozitivní či negativní výsledek.

2.3.4 Chemiluminiscenční imunoanalýza

Chemiluminiscenční imunoanalýza je analýza, která kombinuje chemiluminiscenční systém s imunoreakcemi ke stanovení koncentrace analytů pomocí chemických sond, které generují světlo chemickou reakcí, jež značí protilátku (Xiao et al. 2020).

V posledních desetiletích CLIA zaznamenala velký pokrok a je hojně využívána ve vědách o živé přírodě, klinické diagnostice, monitorování životního prostředí, bezpečnosti potravin a farmaceutické analýze a dalších oblastech, protože jejími výhodami jsou vysoká citlivost

analýzy, široký lineární rozsah, žádné interference rozptýleného světla, žádné radioaktivní kontaminanty, jednoduché vybavení atd (Xiao et al. 2020).

V dnešní době dosáhla CLIA vyšší úrovně detekce díky pomoci nových nanomateriálů (např. zlatých nanočástic, kvantových teček a magnetických materiálů) a spojení s dalšími vyvinutými technologiemi (např. imunochromatografie a mikrofluidní čipy). Ty v posledních letech podpořily velký průlom v účinnosti CLIA (ul Azim et al. 2015).

Potenciál této detekční analýzy je nezanedbatelný a stále se nacházejí nové možnosti lepší optimalizace chemiluminiscenčních systémů prostřednictvím chemických zesilovačů a nanomateriálů, vývojem a využitím multifunkčních protilátek k dosažení simultánní detekce, aplikací nanomateriálů ke zlepšení vysoké citlivosti, specifčnosti a reprodukovatelnosti a spojení CLIA s nově vyvinutými technologiemi k rychlému splnění multianalýzy nebo miniaturizace detekce (Xiao et al. 2020).

S cílem splnit vyšší požadavky na testování a přístroje se CLIA vydala směrem k inteligentnímu, automatickému cíli integrací magnetických částic, laterálního průtoku imunoanalýzy, mikrofluidního čipu a dalších mechanických elektronických zařízení (Xiao et al. 2020). Z těchto a dalších mnohých úprav vznikla metoda časově nenáročná a dostatečně citlivá na to, aby začala postupně nahrazovat jiné méně efektivní metody detekce jako například RIU.

2.3.4.1 Chemiluminiscenční enzymová imunoanalýza

Metoda chemiluminiscenční enzymové imunoanalýzy (CLEIA; *Chemiluminescent enzyme-linked immunoassay*) se široce používá v analytické chemii a bezpečnosti potravin díky svému širokému dynamickému rozsahu, nízké interferenci pozadí, vysoké citlivosti a specifčnosti (He et al. 2019). Klasická CLEIA kombinuje enzymovou reakci s chemiluminiscencí a používá se značením katalyzátoru nebo luminiscenčního činidla na antigenu nebo protilátce. Po sérii imunitních reakcí je nakonec obsah cílového analytu detekován měřením chemiluminiscenčního signálu (Wang et al. 2020).

Tato metoda obvykle vyžaduje velké množství protilátek, které jsou nákladné a obtížně se uchovávají. Z toho důvodu mohou být běžné protilátky v některých případech nahrazeny aptamery nukleových kyselin, díky svým výhodám, kterými jsou nízké náklady na syntézu, stabilní struktura, nízká imunogenicita a nízká toxicita (Man et al. 2020).

Tato metoda detekce CEA umožňuje rychle získat přesné výsledky a dosáhnout vysoké citlivosti, širšího detekčního rozsahu a nižších detekčních limitů než například u CLIA metody.

2.3.5 Radioimunoanalýza

Radioimunoanalýza byla významným mezníkem v oblasti stanovení hormonů. Díky spolupráci Rosalyn Yalowové a Solomona Bersona, kteří vyvinuli techniku radioimunoanalýzy, za niž první z nich obdržel v roce 1977 Nobelovu cenu. Na rozdíl od dříve známých chemických metod, které byly založeny na generování barvy po určité chemické reakci, byla tato nová metoda založena na schopnosti protilátek (Ab) rozpoznávat a specificky se vázat na specifické epitopy na makromolekulách včetně hormonů. Takové testy byly nazvány obecným termínem „imunoanalýzy“, protože byly založeny na imunologickém principu rozpoznávání a vazby specifického antigenu (Ag) imunoglobuliny (Suresh et al. 2011).

Radioimunoanalýza je metoda, kdy se vzorek antigenu a protilátka inkubují společně, což umožní vazbu antigenu vzorku s protilátkou. Poté se přidá radioaktivně značený antigen. Radioaktivně značený antigen soutěží s antigenem vzorku a vytěsňuje jej z protilátky. Měřením radioaktivity lze určit množství radioaktivně značeného antigenu, který se navázal na protilátku, a tedy koncentraci daného antigenu ve vzorku (Grange et al. 2014).

Nevýhody metody RIA souvisejí s nutným použitím radioaktivní značky, a tudíž s krátkou dobou použitelnosti. Oproti tomu, tyto analýzy nepoužívají enzymy, a tím snižují riziko interference ze samotného vzorku (Grange et al. 2014).

Konvenční radioimunoanalýza má mnoho problémů: zejména nedostatečnou automatizaci, krátkou dobu použitelnosti činidel, nutnost provádět testy v dávkách, nikoli jednotlivých vzorků, a různé regulační problémy související s dovozem a manipulací radioaktivních materiálů. Postupně byla nahrazena chemiluminiscenčními metodami, které mají velice podobnou citlivost a nejsou tak náročné na manipulaci (Suresh et al. 2011).

Tabulka 4. Porovnání metod ELISA, ECL, CLIA a RIA, upraveno dle (Azim et al. 2018, Xiao et al. 2020).

Metoda	Mez detekce	Skladovatelnost	Celkový čas	Shrnutí
ELISA	1000 pg/ml	dlouhá	110 min.	jednoduchost a nízké náklady
ECL	0,001 pg/ml	dlouhá	30 min.	nejcitlivější a nejrychlejší metoda
CLIA	2,35 pg/ml	dlouhá	60 min.	alternativa k RIA
RIA	2,26 pg/ml	krátká až střední	100 min.	omezené použití

2.3.6 Imunohistochemie

Imunohistochemie (IHC; *Immunohistochemistry*) je metoda využívající specifickou vazbu protilátek na cílové antigeny v tkáňových řezech, která slouží k detekci a lokalizaci konkrétních proteinů. Tato technika kombinuje principy imunologie (vazba antigen-protilátka) a histologie (zachování tkáňového kontextu) a představuje klíčový nástroj moderní diagnostické patologie, zejména v oblasti onkologie, neuropatologie, infekčních nemocí a výzkumu buněčné diferenciaci (Ramos-Vara 2005). Tato technika je široce využívána v diagnostické patologii, výzkumu i v predikci odpovědi na terapii, zejména v onkologii (Taylor et al. 2006).

Správná příprava vzorku je klíčovým krokem v IHC. Tkáně jsou nejčastěji fixovány ve formaldehydu (nejčastěji 10% neutrálním pufrovaném formalínu) a zalévány do parafinu (FFPE; *Formalin-fixed, paraffin-embedded*). Tato metoda zajišťuje stabilitu tkáně a zachování morfologie. Fixace však může vést k maskování epitopů, což vyžaduje následné provedení antigenní retrievace, tedy obnovení antigenicity narušené fixací. K tomu se využívají techniky tepelné (např. mikrovlnné či tlakové vaření v pufru) nebo enzymatické (např. proteináza K) (Shi et al. 2011).

Hlavní princip IHC spočívá ve vazbě primární protilátky na cílový antigen. K této primární protilátce se následně připojuje sekundární protilátka konjugovaná s enzymem (např. peroxidáza nebo alkalická fosfatáza). Po aplikaci substrátu vzniká barevný produkt, který je detekovatelný mikroskopicky. Alternativně lze použít fluorochromy pro fluorescenční IHC (Cattoretti et al. 1992) jako například fluorescein isothiokyanát (FITC; *Fluorescein isothiocyanate*), který se váže na aminové skupiny protilátek a je relativně fotolabilní (Brelje et al. 1993) nebo tetramethylrhodamin (TRITC; *Tetramethylrhodamine*), jež se využívá hlavně pro dvoubarevné značení s FITC (Wessendorf et al. 1992). Volba primární protilátky a její validace je klíčovým aspektem správného IHC. Musí být zajištěna specificita, senzitivita a reprodukovatelnost. Kromě toho je důležité optimalizovat ředění protilátky, délku inkubace, typ pufru, a metodu blokace nespecifické vazby (Cattoretti et al. 1992).

Pro vysokou kvalitu výsledků při využití fluorochromů je nutné také chránit vzorky před světlem během značení i skladování, neboť jsou tyto látky citlivé na fotodegradaci, což vede ke ztrátě signálu. Fixace vzorků (např. 4 % paraformaldehydem) a propustění (např. Triton X-100) musí být optimalizováno pro zachování antigenní integrity a umožnění průniku značených protilátek (Wessendorf et al. 1992).

Fluorescenční IHC s využitím fluorochromů umožňuje detekci více antigenů současně, vysokou citlivost, a v kombinaci s pokročilými zobrazovacími metodami (např. konfokální mikroskopie) nabízí možnost kvantitativní i prostorové analýzy exprese proteinů (Panchuk-Voloshina et al. 1999).

Existují dvě hlavní metody detekce: nepřímá metoda (použití značené sekundární protilátky) a polymerová metoda, která využívá polymerní komplexy nesoucí více enzymových molekul a protilátek, což zvyšuje citlivost této metody (Ramos-Vara 2005).

Výsledkem IHC je tkáňově specifická lokalizace barveného antigenu, kterou lze hodnotit kvalitativně, semikvantitativně nebo pomocí digitální obrazové analýzy. Interpretace vyžaduje nejen znalost histologické struktury, ale také zkušenosti s variabilitou exprese v různých biologických kontextech (Taylor et al. 2006).

Na rozdíl od sérového měření CEA, které může být ovlivněno celkovým stavem pacienta nebo přítomností jiných onemocnění, IHC přináší morfologický kontext a umožňuje rozlišení mezi benigní a maligní expresí. Je tak využívána při diferenciální diagnostice nejasných nádorových lézí, např. k odlišení metastáz adenokarcinomů s pozitivní expresí CEA od jiných typů nádorů, které CEA neexprimují. To je zvláště důležité při určení původu metastáz v játrech nebo plicích (Yan et al. 2014).

Imunohistochemie má široké uplatnění. V diagnostice nádorů slouží k určení tkáňového původu, histologického typu, prognostických a prediktivních markerů (např. HER2, Ki-67, p53). V patologii infekcí umožňuje vizualizaci patogenů přímo v infikovaných tkáních. Ve výzkumu se IHC využívá ke studiu exprese genů na úrovni proteinu, buněčné signalizace nebo tkáňové distribuce antigenů (Ramos-Vara 2005).

Výhodou IHC detekce CEA je její relativní jednoduchost, široká dostupnost a možnost lokalizace antigenu přímo v histologickém kontextu tkáně. Nevýhodou může být variabilita výsledků v závislosti na použité protilátce, fixaci vzorku a zkušenostech patologa. Přesto zůstává CEA jedním z nejčastěji vyšetřovaných markerů v rutinní onkologické diagnostice, a to nejen sérologicky, ale i právě imunohistochemicky (Goldstein et al. 2005).

3. CÍLE PRÁCE

1. Praktická část bude zaměřena na detekci karcinoembryonálního antigenu u nádorových buněk. V dílčích krocích se bude jednat o optimalizaci imunofluorescenční metody pro detekci karcinoembryonálního antigenu.
2. Získaná experimentální data budou zpracována a diskutována. Výsledky práce se následně porovnají s výstupy jiných autorů.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Pomůcky a přístroje

- Analytické váhy (Mettler Toledo, Švýcarsko)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Buněčný CO₂ inkubátor (Mettler, Německo)
- Centrifuga (Hettich, Německo)
- Cytospiny (8jamková skla pro buněčnou kultivaci) (SPL Life Sciences, Jižní Korea)
- Elektronické pipety (Eppendorf, Německo)
- Fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japonsko)
- Inkubátor (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Invertovaný mikroskop (Carl Zeiss, Německo)
- Krycí sklíčka (Hirschmann, Německo)
- Kultivační lahve (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Laminární box (ESCO, USA)
- Lednice s mrazákem -20 °C (Liebherr, ČR)
- Mikrozkušavky; 0,5; 1,5; 2,5 a 5 ml (Eppendorf, Německo)
- Počítačka buněk (Beckman Coulter, USA)
- Sérologické pipety (Jet Biofil, Čína)
- Spotřební materiál
- Špičky (Eppendorf, Německo)
- Vodní lázeň (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Vortex (Heidolph Instruments, Německo)

Software

- ACD/ChemSketch, verze 12.01 (ACD/Labs, Kanada)
- Microsoft Office Word a Excel (Microsoft, USA)
- Nikon NIS-Elements, verze 5.11.03 (Nikon, Japonsko)

4.2 Seznam použitých chemikálií

- Anti-CEA (CD66e) s Alexa Fluor 594 (Biotechne, USA)
- Anti-Cytokeratin 18 s Alexa Fluor 488 (Invitrogen, USA)
- Deionizovaná voda

- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose*, DMEM (Sigma-Aldrich, USA)
- Faloidin-FITC (C₅₆H₆₀N₁₀O₁₅S₂; Thermo Fischer, USA)
- Fetální bovinní sérum (Gibco, USA)
- Formaldehyd (CH₂O; Erba Lachema, ČR)
- GlutaMAX (Gibco, USA)
- HEPES pufrovací roztok (Gibco USA)
- Hoechst 33258 (C₂₅H₂₇Cl₃N₆O; Merck, USA)
- Hovězí sérový albumin, BSA (Merck, USA)
- L-Glutamin (C₅H₁₀N₂O₃; Gibco, USA)
- Penicilin/Streptomycin (Gibco, USA)
- Pyruvát sodný (C₃H₃NaO₃; Gibco, USA)
- Triton X-100 (C₁₄H₂₂O(C₂H₄O)_n; Merck, USA)

4.3 Příprava roztoků

Pracovní roztok formaldehydu (3,7%):

Pro přípravu pracovního roztoku formaldehydu jsme pipetovali 200 µl 37% zásobního roztoku do 1800 µl DPBS pufru. Roztok jsme před každým použitím připravovali vždy čerstvý a k buňkám přidávali temperovaný na 37 °C.

Pracovní roztok tritonu X-100 (0,1%):

Pro přípravu pracovního roztoku tritonu X-100 jsme pipetovali 2 µl zásobního roztoku (100%) do 1998 µl fosfátového pufru. Roztok byl před každým měřením připravován čerstvý.

Fosfátový pufr (DPBS 1X):

1X DPBS pufr jsme připravili napipetováním 5 ml zásobního pufru DPBS (10X) do 45 ml deionizované vody. Takto připravený pufr byl skladován v lednici při 4 °C.

Pracovní roztok BSA (2,5%):

Pro přípravu 2,5% roztoku BSA jsme rozpustili navážku (m=0,025 g BSA) v 1 ml 1X DPBS pufru. Roztok byl před každým měřením připravován čerstvý.

Pracovní roztok anti-cytokeratin18 (1 µg/ml):

Pro přípravu pracovního roztoku anti-CK18 jsme pipetovali 1 µl zásobního roztoku primární monoklonální protilátky (500 µg/ml) do 499 µl DPBS 1X pufru. Zásobní roztok protilátky jsme

skladovali v lednici při 4 °C. Tento pracovní roztok jsme připravovali přímo před použitím a chránili ho před okolním světlem.

Pracovní roztok anti-CEACAM5 (CD66e) (2 µg/ml):

Pro přípravu pracovního roztoku anti-CEACAM5 jsme pipetovali 5 µl zásobního roztoku primární monoklonální protilátky (200 µg/ml) do 495 µl DPBS 1X pufru. Zásobní roztok protilátky byl skladován v lednici při 4 °C. Pracovní roztok byl připravován přímo před použitím a chráněn před okolním světlem.

Pracovní roztok faloidin–FITC:

Pro přípravu pracovního roztoku faloidin–FITC jsme pipetovali 1,5 µl zásobního roztoku faloidin–FITC (6,6 µM) do 998,5 µl DPBS 1X pufru. Roztok byl připravován vždy čerstvý a skladován ve tmě.

Pracovní roztok Hoechst 33258 (22 µg/ml):

Pro přípravu pracovního roztoku Hoechst 33258 jsme pipetovali 2,2 µl zásobního roztoku Hoechst 33258 (1000 µg/ml) do 98 µl DPBS 1X pufru. Roztok byl připravován vždy čerstvý a byl skladován ve tmě.

4.4 Biologický materiál

Komerční buněčná linie karcinomu žaludku N87 (CRL-5822, ATCC, USA). Pro všechny experimenty v praktické části jsme využívali pro kultivaci těchto buněk speciální plast pro mikroskopii (cytospiny, tedy 8jamková mikroskopická skla).

4.4.1 Kultivace buněčné linie N87

Buněčnou linii N87 jsme kultivovali v kompletním kultivačním médiu. Základní složku tvořilo médium DMEM o vysokém obsahu glukózy. Toto médium bylo obohaceno o 10% (v/v) fetální bovinní sérum, 10 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, penicilin 50 µg/ml a streptomycin 50 µg/ml.

Začátkem kultivace jsme do kultivačních nádob nadávkovali takové množství buněk, aby finální buněčná denzita v 10 ml kultivačního média činila 1×10^6 buněk. Samotná kultivace probíhala v kontrolovaném prostředí při 37 °C ve vyhřívaném inkubátoru se složením atmosféry 5 % CO₂ a 95 % O₂. Intervaly výměny kultivačního média za čerstvé se pohybovaly v rozmezí 48 nebo 72 hod. Interval pasážování byly závislé na dosažení 60% konfluence kultivovaných buněk. Pomocí buněčného analyzátoru (Beckman Coulter, USA) jsme

při každém pasážování určovali buněčnou denzitu a získané výsledky jsme použili pro potřeby dalších subkultivací nebo následných bioanalytických laboratorních měření.

4.5 Stanovení vhodného ředění protilátek

Vizualizace molekuly CEACAM5 se využívá imunofluorescenční barvení s využitím specifické primární protilátky a fluorescenčně značené sekundární protilátky. Pro optimalizaci vhodného titru primární protilátky proti molekule CEACAM5 u buněk N87 jsme zvolili koncentrace titru 1:125, 1:250, 1:500 a 1:1000.

V prvním kroku jsme buňky fixovali s využitím 3,7% formaldehydu (5 min; 37 °C, ve tmě). Po uplynutí inkubace jsme buňky permeabilizovali pomocí 0,1% roztoku Triton X-100 (15 min; 37 °C; ve tmě). Následně jsme buňky promyli 1krát pomocí DPBS pufru (37 °C) a blokovali jsme nespecifické vazby pomocí 100 µl BSA (2,5 %; 30 min; laboratorní teplota). Po inkubaci buněk s blokačním roztokem BSA jsme buňky promyli 1krát DPBS pufrem (37 °C). V posledním kroku jsme k buňkám do každé jamky pipetovali 100 µl anti-CEACAM5 protilátky v ředěních 1:125, 1:250, 1:500 a 1:1000 a nechali inkubovat 24 hod (4 °C, ve tmě). Po ukončení inkubace jsme buňky promyli 3krát DPBS pufrem (37 °C). Následně jsme k buňkám napipetovali 100 µL sekundární protilátky (anti-IgG) a inkubovali 90 min (RT, ve tmě). Různý titr protilátek u buněk jsme pozorovali fluorescenčním mikroskopem (TRITC filtr, 540/25 nm).

4.6 Detekce povrchových markerů buněk

4.6.1 Cytokeratin 18

Cytokeratin 18 (CK18) je protein intermediárního vlákna ze skupiny cytokeratinů kyselého typu a je exprimován především v jednovrstevných nebo také „jednoduchých“ epiteliálních tkáních a karcinomech různého původu (Menz et al. 2021). Známou funkcí CK18 je poskytovat flexibilní intracelulární lešení, které strukturuje cytoplazmu, odolává stresům působícím na buňku zvenčí a udržuje normální mitochondriální struktury. Protein CK18 je také důležitý pro buněčné procesy, jako je apoptóza, mitóza, progresse buněčného cyklu a buněčná signalizace. Kromě toho je CK18 již mnoho let uznáván jako epiteliální marker v diagnostické histopatologii a má důležitou funkci v chování nádorových buněk (Weng et al. 2012). Občasná slabá pozitivita CK18 je pozorována až u 78,3 % typů karcinomů (Menz et al. 2021).

Při detekci CK18 jsme v prvním kroku buňky fixovali pomocí 3,7% formaldehydu (5 min; 37 °C, ve tmě). Následně jsme buňky permeabilizovali pomocí 0,1% roztoku Triton X-100 (15 min; 37 °C; ve tmě). Poté jsme buňky 1 krát promyli pufrem DPBS (37 °C) a blokovali jsme

nespecifické vazby pomocí 100 μ l BSA (2,5 %; 30 min; laboratorní teplota). Po blokaci nespecifické vazby pomocí roztoku BSA jsme buňky promyli 1krát DPBS pufrem (37 °C). Dále jsme k buňkám do každé jamky pipetovali po 100 μ l monoklonální protilátky anti-CK18 (1 μ g/ml). Buňky byly s protilátkou anti-CK18 inkubovány po dobu 24 hodin (4 °C; ve tmě). Po ukončení inkubace jsme buňky promyli 3krát DPBS pufrem (37 °C). Následně jsme k buňkám napipetovali 100 μ L sekundární protilátky (anti-IgG) a inkubovali 90 min (RT, ve tmě). Přítomnost cytokeratinu 18 u buněk jsme pozorovali s využitím fluorescenčního mikroskopu (FITC filtr, 480/30 nm).

4.6.2 Karcinoembryonální antigen

Proteiny, které spadají do skupiny CEA jsou vysoce glykosylované kyselé glykoproteiny a nacházejí se na povrchu buněčných membrán. Podílí se především na buněčné adhezi a fyziologicky se tvoří především během vývoje plodu v prenatálním období. (Grunnet et al. 2012). Po této fázi jsou nízké hladiny CEA považovány za fyziologické, zatímco zvýšené koncentrace jsou spojeny s řadou benigních i maligních patologií. Bylo zjištěno, že CEA přispívá ke karcinogenezi, metastazování a rezistenci na léčbu. Proto se jeho koncentrace v séru široce používá v onkologii pro prognózu, sledování onemocnění a detekci recidivy, a to i přes jeho omezenou senzitivitu a specifitu, které mu brání sloužit jako samostatný diagnostický nástroj. Zvýšené sérové hladiny CEA jsou spojeny s horšími výsledky u rakoviny plic, jater, prsu, tlustého střeva a slinivky břišní (Niedzielska et al. 2025).

Při detekci CEACAM5 jsme v prvním kroku buňky fixovali pomocí 3,7% formaldehydu (5 min; 37 °C, ve tmě). Následně jsme buňky permeabilizovali pomocí 0,1% roztoku Triton X-100 (15 min; 37 °C; ve tmě). Poté jsme buňky 1krát promyli pufrem DPBS (37 °C) a blokovali jsme nespecifické vazby pomocí 100 μ l BSA (2,5 %; 30 min; laboratorní teplota). Po blokaci nespecifické vazby pomocí roztoku BSA jsme buňky promyli 1krát DPBS pufrem (37 °C). Dále jsme k buňkám do každé jamky pipetovali po 100 μ l monoklonální protilátky anti-CEACAM5 (1:250). Buňky byly s protilátkou anti-CEACAM5 inkubovány po dobu 24 hodin (4 °C; ve tmě). Po ukončení inkubace jsme buňky promyli 3krát DPBS pufrem (37 °C). Následně jsme k buňkám napipetovali 100 μ L sekundární protilátky (anti-IgG) a inkubovali 90 min (RT, ve tmě). Přítomnost CEACAM5 u buněk jsme pozorovali s využitím fluorescenčního mikroskopu (TRITC filtr, 540/25 nm).

4.7 Vizualizace buněčné morfologie

4.7.1 Vizualizace aktinových vláken cytoskeletu

Aktin, jeden z nejhodněji zastoupených proteinů v eukaryotních buňkách. Má zásadní význam v různých buněčných procesech, včetně regulace buněčné pohyblivosti, udržování buněčné morfologie, buněčného dělení, regulace transkripce, endocytózy a udržování tvaru eukaryotických buněk (Huang et al. 2025, Gunasekara et al. 2024). Faloidin je heptapeptid získaný z jedovaté houby *Amanita phalloides*. Tento heptapeptid se s vysokou specifitou váže na F-aktin a zabraňuje filamentové depolymerizaci. Využití faloidinu je obvykle vymezeno jen na použití ve fixovaných buňkách kvůli toxicitě způsobené jeho stabilizací aktinových filament a faktu, že není propustný pro buněčné membrány (Mazloom-Farsibaf et al. 2021).

V prvním kroku jsme buňky fixovali přidáním 200 μ l 3,7% formaldehydu (5 min; 37 °C; ve tmě), následně jsme buňky permeabilizovali 200 μ l 0,1 % roztoku Triton X-100 (15 min; 37 °C; ve tmě). Poté jsme buňky promyli 1krát DPBS pufrem (37 °C) a k buňkám pipetovali 100 μ l fluorescenční sondy faloidin-FITC a inkubovali 40 min (laboratorní teplota). Po uplynutí inkubace jsme jednotlivé jamky cytopsinu promyli 3krát pomocí DPBS pufru (37 °C), přiložili krycí sklíčko a vizualizovali aktinová vlákna s využitím fluorescenční mikroskopie (FITC filtr, 480/30 nm).

4.7.2 Vizualizace buněčných jader

Mezi nejpoužívanější fluorescenční barviva pro barvení jader buněk patří DAPI, DIPI, Hoechst 33258, 33342. Uvádí se, že barvivo Hoechst 33342 je oblíbenější pro svou větší propustnost buněčných membrán ve srovnání s barvivem Hoechst 33258 ale zároveň zhruba čtyřikrát dražší (Majumdar et al. 2020). Barviva Hoechst jsou široce používána pro barvení protoplastů, značení DNA a suspenzních buněčných kultur, díky tomu umožňují snadnou vizualizaci jádra a chromozomů. Po excitaci UV světlem (přibližně 360 nm) vyzařuje barvivo Hoechst modré světlo širokého spektra v oblasti kolem 460 nm. Jednoduchost a cenová výhodnost DAPI a Hoechstu způsobují, že jsou využívány převážně jako modré fluorescenční barvivo specifické pro DNA, ačkoli Hoechst se používá přednostně kvůli vyšší propustnosti membránou buněk a nižší cytotoxicitě. Pomocí navázání této látky do oblastí DNA, které jsou bohaté na adenin a thymin se u těchto molekul fluorescence výrazně zvýší (Majumdar et al. 2020, Bucevičius et al. 2018).

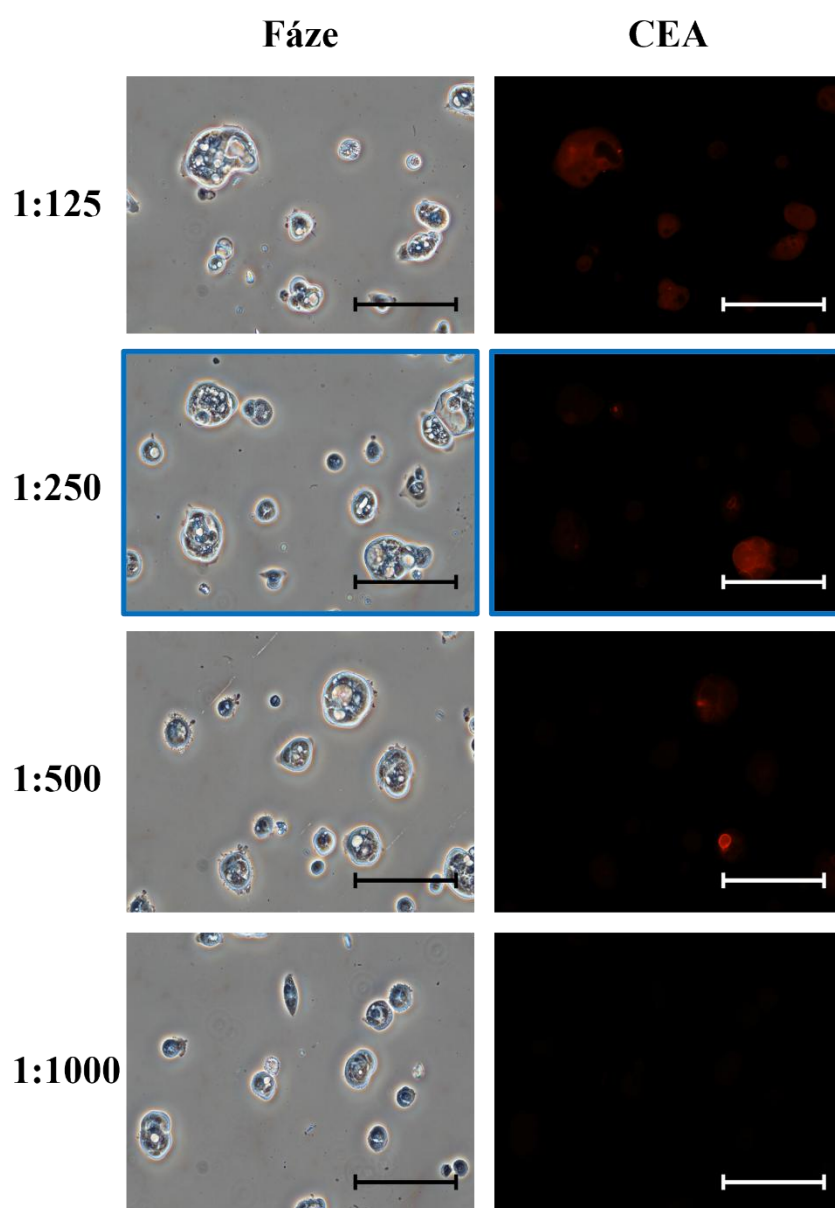
V našich experimentech jsme používali sondu Hoechst 33258, kterou jsme přidávali v objemu 10 μ l (22 μ g/ml) ke 100 μ l média s buňkami. Po 10minutové inkubaci (laboratorní

teplota) jsme buňky 3krát promyli DPBS pufrem (37 °C) a pozorovali je s pomocí fluorescenčního mikroskopu (DAPI filtr, 375/28 nm).

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Optimalizace titru primární protilátky

Pro optimalizaci vizualizace molekuly CEACAM5 na buněčné linii N87 jsme titr primární protilátky stanovili v rozmezí 1:125–1:1000. Detekovaná fluorescence molekuly CEACAM5 byla závislá na koncentraci primární protilátky. Jak je z výsledků patrné (Obrázek 4), nejintenzivnější fluorescence molekuly CEACAM5 byla detekována při ředění primární



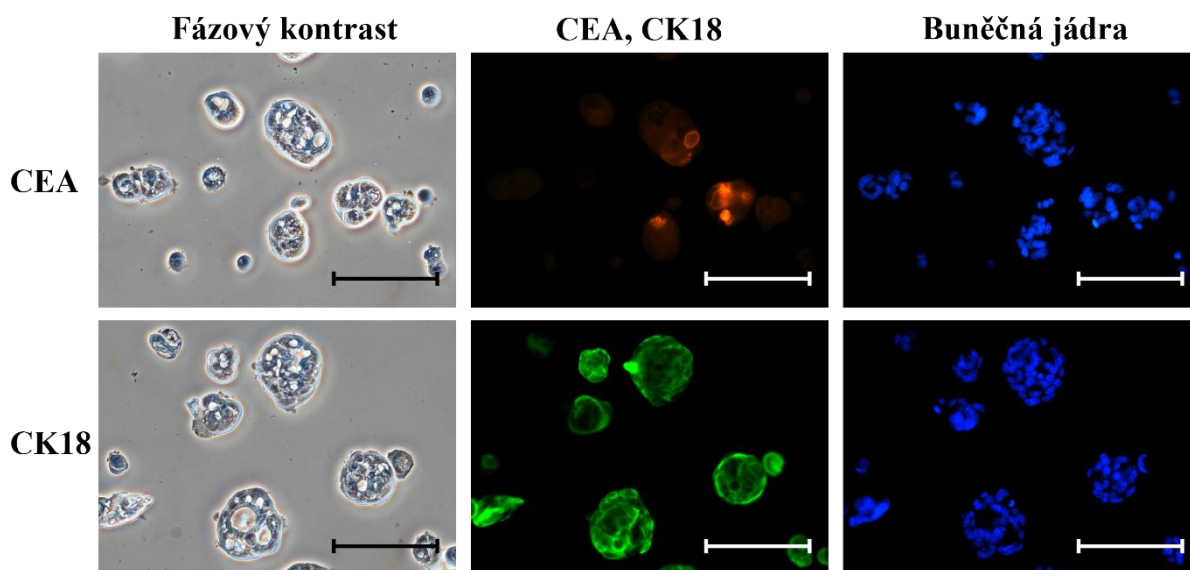
Obrázek 4. Optimalizace koncentrace primární protilátky proti CEACAM5 u buněk N87. Titr primární protilátky: 1:125, 1:250, 1:500 a 1:1000, fázový kontrast; fluorescence ($\lambda_{Ex/Em} = 540/25$ nm); zvětšení 200x; měřítko 100 μ m.

protilátky 1:125, nejslabší při ředění 1:1000. Vzhledem ke skutečnosti, že intenzita fluorescenčního signálu při ředění 1:125 byla srovnatelná s ředěním 1:250 bylo ředění primární protilátky 1:250 (modře označené na Obrázku 4), použito pro další experimenty. V jiné práci byly využity koncentrace anti-CEACAM5 například v rozmezích 1:10–1:50 (Albanopoulos et al. 2000), z důvodu značně kratší doby inkubace a využití jiné detekční metody. U dalších vědeckých pokusů byli využívány jiné buněčné linie, například buněčná linie COLM-2 (Ito et al. 2002), buňky medulárního karcinomu štítné žlázy (Blumenthal et al. 2008) nebo buňky z adenokarcinomu lidského tlustého střeva (Gold et al. 1965).

5.2 Detekce vybraných povrchových markerů

V druhém úseku praktické části jsme detekovali povrchové markery buněk N87. Námi vybranými povrchovými markery byli konkrétně cytokeratin 18 a karcinoembryonální antigen, v pracích jiných autorů byly také využity linie MKN-45 a MKN-74 (Takaishi et al. 2009) a byly navíc zjišťovány další povrchové nádorové markery jako například CD44, CD24 (Takaishi et al. 2009) či CD90 (Shu et al. 2019), které se využívají k identifikaci buněk a nádorů. Detekovaná fluorescence cytokeratinu 18 byla výrazné zelené barvy a byla zřetelně viditelná v buněčných oblastech bohatých na cytoplazmu. Pro detekci karcinoembryonálního antigenu jsme využili titr primární protilátky z prvního optimalizačního úseku praktické části.

Intenzita fluorescence CK18 nám potvrdila epiteliální původ námi využívaných buněk, jelikož CK18 je markerem epiteliálního původu buněk. Intenzita fluorescence CEACAM5

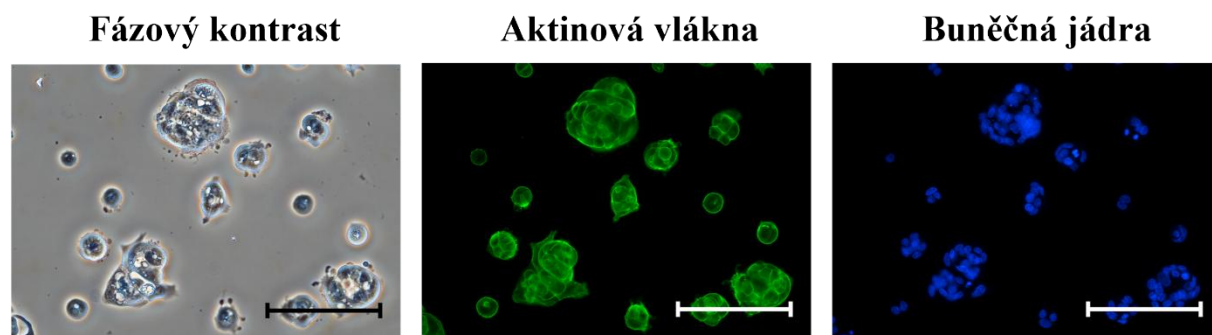


Obrázek 5. Detekce povrchových markerů CEA a CK18 u buněk N 87. Zobrazení CEA, CK18 a buněčných jader, fázový kontrast; fluorescence ($\lambda_{Ex/Em} = 540/25$ nm); fluorescence ($\lambda_{Ex/Em} = 480/30$ nm); fluorescence ($\lambda_{Ex/Em} = 375/28$ nm); zvětšení 200x; měřítko 100 μ m.

potvrdila výskyt této molekuly na povrchu využívaných buněk. Dodatečně jsme vizualizovali buněčná jádra, která jsou reprezentována modrou fluorescencí sondy Hoechst 33258 uvnitř buněk (Obrázek 5).

5.3 Vizualizace cytoskeletu a jader buněk

V posledním úseku praktické části jsme vizualizovali morfologii buněčné gastrické linie N87, pomocí obarvení buněčných jader a aktinových vláken cytoskeletu, které mají fyziologicky kompaktní tvar a na základě výsledků, je zřejmé, že buňky jsou kompaktní a nejsou poškozeny (Obrázek 6). Deriváty faloidinu byli využity i v jiných experimentálních pracích pro zobrazení aktinových vláken (Belin et al. 2013, Schröder et al. 2023). Pro označení jader buněk v dalších vědeckých pokusech uplatnili autoři ale i další chromofory například ALEXA 488 (Kues et al. 2001) nebo DAPI (Sun et al. 2017). Pro zobrazení buněčných struktur či integrity buněk, převážně z důvodů testování cytotoxicity, byli využity různé buněčné linie jako NCI-H660, (Albanopoulos et al. 2000), proto byli ale zvoleny jiné metody vizualizace či detekce jako například ELISA (Baek et al. 2022), průtoková cytometrie (Albanopoulos et al. 2000) či imunoelektroforéza (Gold et al. 1965) a tím pádem i jiné postupy.



Obrázek 6. Vizualizace aktinových vláken a buněčných jader linie N87. Fázový kontrast; fluorescence ($\lambda_{\text{Ex/Em}} = 540/25 \text{ nm}$); fluorescence ($\lambda_{\text{Ex/Em}} = 480/30 \text{ nm}$); fluorescence ($\lambda_{\text{Ex/Em}} = 375/28 \text{ nm}$); zvětšení 200x; měřítko 100 μm .

6. ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývá rodinou karcinoembryonálních antigenů, konkrétně skupinou CEACAM, kde hlavním využívaným členem této skupiny je CEACAM5 neboli také CEA, sloužící společně s dalšími vybranými antigeny k screeningu karcinomů, predikci výsledků operativních zákroků, potenciální následnou léčbu či recidivu těchto onemocnění.

Teoretická část popisuje skupinu karcinoembryonálních antigenů obecně, jejich genetickou expresi a využití v klinické praxi. Mimoto blíže specifikuje fyziologickou funkci, strukturu a vlastnosti skupiny CEACAM, což jsou glykované glykoproteiny ukotvené na membráně buněk. Následnou částí jsou konkretizováni jedni z nejvyužívanějších členů této skupiny v klinické a experimentální praxi CEACAM1, CEACAM5 a CEACAM6. Koncem této části jsou vypsány nejběžnější metody detekce karcinoembryonálních antigenů, společně s jejich charakterizací.

V experimentální části byl nejprve otestován, pomocí dvojkové řady ředění, a stanoven vhodný titr primárních protilátek anti-CEACAM5, který byl následně uplatněn v následujícím kroku při detekci povrchových markerů imunofluorescenční metodou. Na závěr byla znázorněna vnitřní struktura buněk buněčné linie N87, které jsme využívali v této práci.

Z výsledků této práce lze odvodit, že vhodným titrem primární protilátky anti-CEACAM5 u buněčné linie N87 za použití imunofluorescenční metody je 1:250. Na povrchu této gastrické buněčné linie lze také detekovat biomarkery jako například CEACAM5 či CK18.

Detekce klinických biomarkerů jako jsou karcinoembryonální antigeny představuje jednodušší a včasnou diagnostiku karcinomů v raném stádiu, kdy je léčba nejvíce účinná. Zároveň mohou tyto proteiny ve vzájemných kombinacích odlišit typy nádorů, čímž poskytují přesnější diagnózu a mohou tím pádem zjednodušit výběr cílené léčby a následné sledování účinnosti léčby.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. **Albanopoulos K., Armakolas A., et al.** "Prognostic significance of circulating antibodies against carcinoembryonic antigen (anti-CEA) in patients with colon cancer." *The American journal of gastroenterology*, 95.4 (2000): 1056-1061. doi: 10.1016/S0002-9270(00)00774-7.
2. **Alhajj M., Zubair M., et al.** „Enzyme linked immunosorbent assay.“ *StatPearls*, (2023). Dostupné z <https://www.statpearls.com/point-of-care/21178>.
3. **Azim, M. A. ul, Hasan, M., et al.** „Chemiluminescence Immunoassay: Basic Mechanism and Applications.“ *Bangladesh Journal of Nuclear Medicine*, 18.2 (2018): 171–178. doi:10.3329/bjnm.v18i2.35240.
4. **Baek D. S., Kim Y. J., et al.** "A highly-specific fully-human antibody and CAR-T cells targeting CD66e/CEACAM5 are cytotoxic for CD66e-expressing cancer cells in vitro and in vivo." *Cancer letters*, 525 (2022): 97-107. doi: 10.1016/j.canlet.2021.10.041.
5. **Beauchemin, N. and Arabzadeh, A.** „Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis.“ *Cancer Metastasis Reviews*, 32.3–4 (2013): 643–671. doi: 10.1007/s10555-013-9444-6.
6. **Becerra C. R.** „The clinical utility of serum tumor markers in lung cancer.“ *Current Oncology Reports*, 6.3 (2004): 241–246. doi: 10.1007/s11912-004-0026-z.
7. **Belin B. J., Cimini B. A., et al.** „Visualization of actin filaments and monomers in somatic cell nuclei.“ *Molecular biology of the cell*, 24.7 (2013): 982-994. doi:10.1091/mbc. e12-09-0685.
8. **Blat D., Zigmond E., et al.** „Suppression of murine colitis and its associated cancer by carcinoembryonic antigen-specific regulatory T cells.“ *Mol Ther*, 22 (2014): 1018–28. doi:10.1038/mt.2014.41.
9. **Blumenthal R. D., H. J. Hansen, et al.** "In vitro and in vivo anticancer efficacy of unconjugated humanised anti-CEA monoclonal antibodies." *British journal of cancer*, 99.5 (2008): 837-838. doi: 10.1038/sj.bjc.6604548.
10. **Blumenthal R. D., Hansen H. J., et al.** „In vitro and in vivo studies of CEACAM5 expression in human gastric carcinoma cell lines: implications for immunotargeting.“ *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 32.9 (2017): 363–370. doi: 10.1089/cbr.2017.2296.
11. **Blumenthal R. D., Hansen H. J., et al.** „Inhibition of adhesion, invasion, and metastasis by antibodies targeting CEACAM6 (NCA-90) in pancreatic carcinoma.“ *Cancer Research*, 67.20 (2007): 9709–9716. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1296.
12. **Brelje, T. C., Wessendorf M. W., et al.** “Multicolor laser scanning confocal immunofluorescence microscopy: practical application and limitations.“ *Methods in Cell Biology*, 38 (1993): 97–181. doi: 10.1016/S0091-679X(08)61514-2.
13. **Bucevičius J, Lukinavičius G, et al.** „The Use of Hoechst Dyes for DNA Staining and Beyond.“ *Chemosensors*, 6.2 (2018):18. doi:10.3390/chemosensors6020018.
14. **Carpelan-Holmström M., Haglund C. et al.** „Serum tumor markers CEA, CA 50, and CA 242 in colorectal cancer.“ *International Journal of Cancer*, 101.6 (2002): 545–548. doi: 10.1002/ijc.10646.
15. **Cattoretti G., Becker M. H., et al.** „Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections.“ *Journal of Pathology*, 168.4 (1992): 357–363. doi:10.1002/path.1711680407.

16. **Desbene C, and O. Gaillard.** „Caractéristiques immuno-analytiques de l’antigène carcino-embryonnaire." *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 28.5-6 (2013): 378-385. doi: 10.1016/j.immbio.2013.05.002.
17. **Duffy M. J.** „Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful?“ *Clinical Chemistry*, 47.4 (2001): 624–630. doi: 10.1093/clinchem/47.4.624.
18. **Duxbury M. S., Ito H., et al.** „CEACAM6 is a determinant of pancreatic adenocarcinoma cellular invasiveness.“ *British Journal of Cancer*, 91.7 (2004): 1384–1390. doi: 10.1038/sj.bjc.6602124.
19. **Filiberti R., Parodi S., et al.** „Diagnostic value of mesothelin in pleural fluids: comparison with CYFRA 21-1 and CEA.“ *Medical oncology*, 30 (2013): 1-9. doi:10.1007/s12032-013-0543-6.
20. **Fiori, V, Magnani, M, et al.** "The expression and modulation of CEACAM1 and tumor cell transformation." *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, 48 (2012): 161-171. Dostupné z <https://www.scielosp.org/article/aiss/2012.v48n2/161-171/>.
21. **Gazdar A. F., and J. D. Minna.** "NCI series of cell lines: an historical perspective." *Journal of Cellular Biochemistry*, 63.S24 (1996): 1-11. doi:10.1002/jcb.240630502.
22. **Gemei M., Mirabelli P., et al.** "CD66c is a novel marker for colorectal cancer stem cell isolation, and its silencing halts tumor growth in vivo." *Cancer*, 119.4 (2013): 729-738. doi:10.1002/cncr.27794.
23. **Gold P., and S. O. Freedman.** "Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques." *The Journal of experimental medicine*, 121.3 (1965): 439-462. doi:10.1084/jem.121.3.439.
24. **Goldstein N. S., Hewitt S. M., et al.** „Recommendations for improved standardization of immunohistochemistry.“ *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 13.1 (2005): 1–10. doi: 10.1097/01.pai.0000148663.71524.f0.
25. **Grange, R. D., J. P. Thompson, et al.** "Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays." *British journal of anaesthesia*, 112.2 (2014): 213-216. doi:10.1093/bja/aet293.
26. **Grunnet, M, and Sorensen, J. B.** „Carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor marker in lung cancer.“ *Lung cancer*, 76.2 (2012): 138-143. doi: 10.1016/j.lungcan.2011.11.012.
27. **Gunasekara H., Perera T., et al.** „Phalloidin-PAINT: Enhanced quantitative nanoscale imaging of F-actin.“ *Biophysical Journal*, 123.18 (2024): 3051-3064. doi: 10.1016/j.bpj.2024.07.003.
28. **Hall C, Clarke L, et al.** „A Review of the Role of Carcinoembryonic Antigen in Clinical Practice.“ *Ann Coloproctol*, 35.6 (2019): 294-305. doi: 10.3393/ac.2019.11.13.
29. **Hammarström, S.** "The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues." *Seminars in cancer biology*, Vol. 9. No. 2. Academic Press, (1999). doi:10.1006/scbi.1998.0119.
30. **Han J, Li, Y, et al.** "A novel sandwich-type immunosensor for detection of carcinoembryonic antigen using silver hybrid multiwalled carbon nanotubes/manganese dioxide." *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 786 (2017); 112-119. doi: 10.1016/j.jelechem.2017.01.021.
31. **He S., He L., et al.** „Development of a rapid and sensitivity magnetic chemiluminescence immunoassay for DNA methyltransferase 1 in human serum.“ *Chinese Chemical Letters*, 30.5 (2019): 1031-1034. doi: 10.1016/j.cclet.2019.03.013.

32. **Hu L., and Xu G.** "Applications and trends in electrochemiluminescence." *Chemical Society Reviews*, 39.8 (2010): 3275-3304. doi:10.1039/B923679C.
33. **Huang J., Wen G., et al.** „Visualization of F-Actin Through Expansion Microscopy (ExM) with Trifunctional Linker-Conjugated Phalloidin.“ *Bio Protoc*, 15.8 (2025): e5273. doi: 10.21769/BioProtoc.5273.
34. **Chen J., Liu X., et al.** „miR-135 and miR-200 family members regulate CEACAM5 expression in gastrointestinal cancers.“ *Oncotarget*, 6.26 (2015): 22309–22322. doi: 10.18632/oncotarget.4069.
35. **Chen W., Jie W. U., et al.** „Chemiluminescent immunoassay and its applications.“ *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 40.1 (2012): 3-10. doi:10.1016/S1872-2040(11)60518-5.
36. **Chhikara, B.S. and Parang, K.** „Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis.“ *Chemical Biology Letters*, 10, 1 (2023): 451. Dostupné z <https://pubs.thesciencein.org/journal/index.php/cbl/article/view/451>.
37. **Chung L., Moore K., et al.** „Serum CEACAM6 as a biomarker in pancreatic cancer: a systematic review.“ *PLoS ONE*, 6.10 (2011): e27558. doi: 10.1371/journal.pone.0027558.
38. **Isacke C. M., and M. A. Horton.** "CEACAM family: Carcinoembryonic antigen cell adhesion family, CD66 family, C-CAM family." *The Adhesion Molecule FactsBook*, (2007): 103. doi: 10.1016/B978-012356505-1/50031-9.
39. **Ishaq Z, Zaheer T, et al.** „Immunoinformatics aided designing of a next generation poly-epitope vaccine against uropathogenic Escherichia coli to combat urinary tract infections.“ *J Biomol Struct Dyn*, 42.21 (2024):11976-11996. doi: 10.1080/07391102.2023.2266018.
40. **Ismail M., Zaghoul A., et al.** "Membranous expression of pan CD66, CD66a, CD66b, and CD66c and their clinical impact in acute leukemia: cross sectional longitudinal cohort study in Saudi Arabia." *J Leuk*, 5.2 (2017): 230-9.doi:10.4172/2329-6917.1000230.
41. **Ito S., Nakanishi H., et al.** „Quantitative detection of CEA expressing free tumor cells in the peripheral blood of colorectal cancer patients during surgery with real-time RT-PCR on a LightCycler.“ *Cancer letters*, 183.2 (2002): 195-203. doi:10.1016/S0304-3835(02)00157-X.
42. **Jeong S., Park M. J., et al.** „Current immunoassay methods and their applications to clinically used biomarkers of breast cancer.“ *Clinical biochemistry*, 78 (2020): 43-57. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2020.01.009.
43. **Joshi S., Kallappa S., et al.** „Simple diagnosis of cancer by detecting CEA and CYFRA 21-1 in saliva using electronic sensors.“ *Scientific Reports*, 12.1 (2022): 15315. doi:10.1038/s41598-022-19593-8.
44. **Josko D.** "Updates in immunoassays: virology." *Clinical Laboratory Science*, 25.3 (2012): 179. Dostupné z <https://clsjournal.ascls.org/content/ascls/25/3/179.full.pdf>.
45. **Kankanala V., Zubair M., et al.** „Carcinoembryonic Antigen.“ *StatPearls* (2024). Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK578172>.
46. **Kelleher, M, Singh, R, et al.** "Carcinoembryonic antigen (CEACAM) family members and inflammatory bowel disease." *Cytokine & growth factor reviews*, 47 (2019): 21-31. doi: 10.1016/j.cytogfr.2019.05.008.

47. **Kim Y. S., Row S. H., et al.** "Signaling pathways in up-regulation of CEA in human colorectal cancer cells." *International Journal of Cancer*, 118.1 (2006): 88–94. doi: 10.1002/ijc.21298.
48. **Kiyokawa N., Iijimam K., et al.** "Significance of CD66c expression in childhood acute lymphoblastic leukemia." *Leukemia research*, 38.1 (2014): 42-48. doi: 10.1016/j.leukres.2013.10.008.
49. **Kricka, L. J.** „Interferences in immunoassay — still a threat.“ *Clinical Chemistry*, 46.8 (2000): 1037–1038. doi: 10.1093/clinchem/46.8.1037.
50. **Kues T., Peters R., et al.** „Visualization and tracking of single protein molecules in the cell nucleus.“ *Biophysical journal*, 80.6 (2001): 2954-2967. doi: 10.1016/S0006-3495(01)76261-3.
51. **Kuespert K., Pils S., et al.** „CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology.“ *Current opinion in cell biology*, 18.5 (2006): 565-571. doi: 10.1016/j.ceb.2006.08.008.
52. **Lee J. H., and Lee S. W.** "The roles of carcinoembryonic antigen in liver metastasis and therapeutic approaches." *Gastroenterology research and practice*, 2017.1 (2017). doi:10.1155/2017/7521987.
53. **Lemieux M., Bouchard F., et al.** „The NCI-N87 cell line as a gastric epithelial barrier model for drug permeability assay.“ *Biochemical and biophysical research communications*, 412.3 (2011): 429-434. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.106.
54. **Liu J. N., Wang H. B., et al.** "CEACAM5 has different expression patterns in gastric non-neoplastic and neoplastic lesions and cytoplasmic staining is a marker for evaluation of tumor progression in gastric adenocarcinoma." *Pathology-Research and Practice*, 210.10 (2014): 686-693. doi: 10.1016/j.prp.2014.06.024.
55. **Liu M., Jia C., et al.** "Novel colorimetric enzyme immunoassay for the detection of carcinoembryonic antigen." *Talanta*, 81.4-5 (2010): 1625-1629. doi: 10.1016/j.talanta.2010.03.014.
56. **Locker, G. Y., Hamilton, S., et al.** „ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer.“ *Journal of Clinical Oncology*, 24.33 (2006): 5313–5327. doi: 10.1200/JCO.2006.08.2644.
57. **Ma K., Wang X., et al.** „CEACAM5 Enriches Human Hematopoietic Stem Cells and Regulates Stem Cell Repopulating Capacity“ 26.12 (2023). doi: 10.1016/j.isci.2023.108561.
58. **Majumdar S., Guha T., et al.** "A basic method for Hoechst (33258) staining of nuclei from whole root tissues of *Oryza sativa*." *National Academy Science Letters*, 43 (2020): 389-392. doi:10.1007/s40009-019-00865-3.
59. **Man J., Dong J., et al.** „Simultaneous detection of VEGF and CEA by time-resolved chemiluminescence enzyme-linked aptamer assay.“ *International journal of nanomedicine*, (2020): 9975-9985. doi:10.2147/IJN.S286317.
60. **Mazloom-Farsibaf H., Farzam F., et al.** „Comparing lifeact and phalloidin for super-resolution imaging of actin in fixed cells.“ *PLoS One*, 16.1 (2021). doi: 10.1371/journal.pone.0246138.
61. **Meng, Q, Shi, S, et al.** "Diagnostic and prognostic value of carcinoembryonic antigen in pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis." *OncoTargets and therapy*, (2017): 4591-4598. doi:10.2147/OTT.S145708.

62. **Menz, A., Weitbrecht, T., et al.** „Diagnostic and prognostic impact of cytokeratin 18 expression in human tumors: a tissue microarray study on 11,952 tumors.“ *Mol Med*, 27, (2021):16. doi:10.1186/s10020-021-00274-7.
63. **Mizobata S., Tompkins K., et al.** „Induction of cytotoxic T cells and their antitumor activity in mice transgenic for carcinoembryonic antigen.“ *Cancer Immunol Immunother*, 49 (2000): 285–95. doi:10.1007/s002620000116.
64. **Mutalib P. K.S., Dardjat M. T., et al.** "The dancing of CD4 and CD8-PE in the firecrackers corridor increase the sensitivity-specificity of CD66e (CEA) colorectal carcinoma patients." *Cytometry Research*, 20.1 (2010): 31-34. doi:10.18947/cytometryresearch.20.1_31.
65. **Nagaishi T., Iijima H., et al.** „Role of CEACAM1 as a regulator of T cells.“ *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1072.1 (2006): 155-175. doi:10.1196/annals.1326.004.
66. **Nataraj S. M., Prema C.L., et al.** "Major protein of carcinoembryonic antigen gene family-CD66c, a novel marker in colon carcinoma." *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 10.2 (2016): XC01. doi: 10.7860/JCDR/2016/17180.7286.
67. **Niedzielska J. and Jastrzębski T.** „Carcinoembryonic Antigen (CEA): Origin, Role in Oncology, and Concentrations in Serum and Peritoneal Fluid.“ *Journal of Clinical Medicine*, 14.9 (2025): 3189. doi:10.3390/jcm14093189.
68. **Ordonez C., Screaton R. A., et al.** „Human CEACAM5 Interacts With Integrin $\alpha 5\beta 1$ and Initiates a Src Kinase–Dependent Signaling Cascade That Enhances Cell Migration.“ *Gastroenterology*, 144.4 (2013): 659–669. doi: 10.1053/j.gastro.2012.11.038.
69. **Ordonez N. G.** „Value of carcinoembryonic antigen immunostaining in tumor diagnosis: a review and update.“ *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 11.1 (2003): 1–10. doi: 10.1097/00129039-200303000-00001.
70. **Panchuk-Voloshina N., Haugland R. P., et al.** „Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates.“ *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47.9 (1999): 1179–1188. doi: 10.1177/002215549904700910.
71. **Park J. W., Lee S. B., et al.** „Epigenetic regulation of CEACAM5 and CEACAM6 in colorectal cancer: potential role of gene methylation and histone modification.“ *Journal of Pathology*, 227.3 (2012): 248–260. doi: 10.1002/path.4000.
72. **Prall F, Nollau P, et al.** "CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues." *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 44.1 (1996): 35-41. doi:10.1177/44.1.8543780.
73. **Ramos-Vara J. A.** „Technical aspects of immunohistochemistry.“ *Veterinary Pathology*, 42.4 (2005): 405–426. doi:10.1354/vp.42-4-405.
74. **Roda G., Jianyu, X., et al.** „Characterizing CEACAM5 interaction with CD8 α and CD1d in intestinal homeostasis.“ *Mucosal immunology*, 7.3 (2014): 615-624. doi:10.1038/mi.2013.80.
75. **Shi S. R., Shi Y., et al.** „Antigen retrieval techniques: current perspectives.“ *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 59.1 (2011): 13–32. doi: 10.1369/jhc.2010.957191.
76. **Shirasu N., Nam J. M., et al.** „Clinical potential of targeted therapy using CEA-expressing cancer models.“ *Oncotarget*, 7.21 (2016): 32646–32661. doi: 10.18632/oncotarget.8862.

77. **Shu, X., Liu, H., et al.** „Distinct biological characterization of the CD44 and CD90 phenotypes of cancer stem cells in gastric cancer cell lines.“ *Mol Cell Biochem*, 459 (2019): 35–47. doi:10.1007/s11010-019-03548-1.
78. **Schröder S. K., Tag C. G., et al.** „Phalloidin staining for F-actin in hepatic stellate cells.“ *Hepatic Stellate Cells: Methods and Protocols*, New York, NY: Springer US, (2023): 55–66. doi: 10.1007/978-1-0716-3207-9_4.
79. **Simon, K.** "Colorectal cancer development and advances in screening." *Clinical interventions in aging*, (2016): 967-976. doi:10.2147/CIA.S109285.
80. **Sun H., Liu J., et al.** „Advances in carcinoembryonic antigen detection: a review of clinical applications and standardization.“ *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (2025): 1-14. doi:10.1007/s00216-025-05772-9.
81. **Sun J., Zhang J., et al.** „Microfluidic Cell Cycle Analysis of Spread Cells by DAPI Staining.“ *Micromachines*, 8.2 (2017): 36. doi:10.3390/mi8020036.
82. **Suresh, V., Kumar E., et al.** "Cost-effectiveness and other tangible benefits of chemiluminescence immunoassay in comparison to radioimmunoassay and immunoradiometric assay." *Thyroid Research and Practice*, 8.1 (2011): 11-23. Dostupné z https://journals.lww.com/trap/citation/2011/08010/Cost_effectiveness_and_other_tangible_benefits_of.5.aspx.
83. **Tabrizi M. A., Tseng C. M., et al.** „Antibody Therapeutics Targeting CEA: Preclinical and Clinical Perspectives.“ *Molecular Cancer Therapeutics*, 21.3 (2022): 345–356. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-21-0574.
84. **Takaishi S., Okumura T., et al.** "Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44." *Stem cells*, 27.5 (2009): 1006-1020. doi:10.1002/stem.30.
85. **Tanaka F., Kawano Y., et al.** „Prognostic significance of carcinoembryonic antigen expression in gastric carcinoma.“ *Cancer*, 89.7 (2000): 1425–1432. doi:10.1002/1097-0142(20001001)89:7<1425::AID-CNCR15>3.0.CO;2-Z.
86. **Tanner A. R., Ward J., et al.** „S30 CEACAM5 (CD66e) mucosal immunoreactivity and its relationship to asthma.“ (2018). doi:10.1136/thorax-2018-212555.36.
87. **Taylor C. R., Levenson R. M.** „Quantification of immunohistochemistry—issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II.“ *Histopathology*, 49.4 (2006): 411–424. doi:10.1111/j.1365-2559.2006.02513.x.
88. **Thomas J, Klebanov A, et al.** „CEACAMS 1, 5, and 6 in disease and cancer: interactions with pathogens“ *Genes Cancer*, 14 (2023): 12. doi: 10.18632/genesandcancer.230.
89. **Thompson J. A., Grunert F., et al.** „Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives.“ *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 9.4 (2010): 175–191. doi:10.1002/jcla.1860090402.
90. **Thompson, J. A., Grunert, F., et al.** „Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives.“ *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 14.3 (2000): 67–79. doi: 10.1002/(SICI)1098-2825(2000)14:3<67::AID-JCLA1>3.0.CO;2-0.
91. **Tchoupa A. K., Schuhmacher T., et al.** "Signaling by epithelial members of the CEACAM family—mucosal docking sites for pathogenic bacteria." *Cell communication and signaling*, 12 (2014): 1-10. doi.org/10.1186/1478-811X-12-27.

92. **ul Azim M.A, Hasan M., et al.** "Chemiluminescence immunoassay: basic mechanism and applications." *Bangladesh Journal of Nuclear Medicine*, 18.2 (2015): 171-178. doi:10.3329/bjnm.v18i2.35240.
93. **Wang C., Liu S., et al.** "Electrochemiluminescence nanoemitters for immunoassay of protein biomarkers." *Bioelectrochemistry*, 149 (2023). doi: 10.1016/j.bioelechem.2022.108281.
94. **Wang G., Wan Y., et al.** „Development of a novel chemiluminescence immunoassay for the detection of procalcitonin.“ *Journal of Immunological Methods*, (2020): 484. doi: 10.1016/j.jim.2020.112829.
95. **Wang J., He L., et al.** „Knockdown of CEACAM5 inhibits proliferation and invasion of gastric cancer cells in vitro and in vivo.“ *Oncology Reports*, 26.4 (2011): 893–900. doi: 10.3892/or.2011.1346.
96. **Wautier J. L., & Wautier M. P.** „Old and new blood markers in human colorectal cancer.“ *International journal of molecular sciences*, 23.21 (2022). doi:10.3390/ijms232112968.
97. **Wei X., Qiao X., et al.** "A label-free ECL aptasensor for sensitive detection of carcinoembryonic antigen based on CdS QDs@ MOF and TEOA@ Au as bi-coreactants of Ru (bpy) $32+$." *Microchemical Journal*, 173 (2022): doi: 10.1016/j.microc.2021.106910.
98. **Weng Y. R., Cui Y., et al.** "Biological functions of cytokeratin 18 in cancer." *Molecular Cancer Research*, 10.4 (2012): 485-493. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0222.
99. **Wessendorf M. W. and Brelje T. C.** „Which fluorochrome is brightest? A comparison of fluorochromes for use in double – and triple-label immunofluorescence methods.“ *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 40.9 (1992): 1259–1268. doi: 10.1177/40.9.1506706.
100. **Wild C.P., Weiderpass E, et al.** „World Cancer Report: Cancer research for cancer prevention.“ *Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer*, (2020). Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK606505/>.
101. **Wild D., John R., et al.** „The immunoassay handbook: theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques.“ *Newnes*, 2013. doi: 10.1016/C2010-0-66244-4.
102. **Wu C.C., Yang S.F., et al.** "Absence of CD66a expression is associated with high microvessel density and high histologic grade in hepatocellular carcinoma." *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 32.6 (2016): 306-312. doi: 10.1016/j.kjms.2016.05.007.
103. **Wu G., Wang D., et al.** „The emerging roles of CEACAM6 in human cancer.“ *International journal of oncology*, 64.3 (2024): 27. doi:10.3892/ijo.2024.5615.
104. **Wu L., and Qu X.** "Cancer biomarker detection: recent achievements and challenges." *Chemical Society Reviews*, 44.10 (2015): 2963-2997. doi:10.1039/C4CS00370E.
105. **Xiao Q., and Xu C.** "Research progress on chemiluminescence immunoassay combined with novel technologies." *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 124 (2020). doi: 10.1016/j.trac.2019.115780.
106. **Yan B., Yau E. X. Y., et al.** „A comparison of immunohistochemical markers for the diagnosis of colorectal carcinoma: a tissue microarray study.“ *Modern Pathology*, 27 (2014): 493–501. doi:10.1038/modpathol.2013.164.

107. **Zhang C, Zheng W, et al.** „Postoperative carcinoembryonic antigen (CEA) levels predict outcomes after resection of colorectal cancer in patients with normal preoperative CEA levels.“ *Transl Cancer Res*, 9.1 (2020): 111-118. doi: 10.21037/tcr.2019.11.27.
108. **Zhang X, Han X, et al.** „CEACAM5 stimulates the progression of non-small-cell lung cancer by promoting cell proliferation and migration.“ *Journal of International Medical Research*, 48.9 (2020). doi:10.1177/0300060520959478.
109. **Zhao, W., Zhang Y., et al.** "Abnormal expression of CD66a promotes proliferation and inhibits apoptosis of human leukemic B cells in vitro." *Leukemia & Lymphoma*, 56.1 (2015): 202-210. doi:10.3109/10428194.2014.913287.
110. **Zhou J., Fan X., et al.** "Identification of CEACAM5 as a biomarker for prewarning and prognosis in gastric cancer." *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 63.12 (2015): 922-930. doi:10.1369/0022155415609098.
111. **Zid M. and Drouin G.** „Gene conversions are under purifying selection in the carcinoembryonic antigen immunoglobulin gene families of primates“, *Genomics*, 102, no. 4 (2013): 301–309. doi: 10.1016/j.ygeno.2013.07.003.
112. **Zi-Yang Y, Kaixun Z, et al.** „Carcinoembryonic antigen levels are increased with pulmonary output in pulmonary hypertension due to congenital heart disease“. *J Int Med Res*, 48.11 (2020). doi: 10.1177/0300060520964378.