

Nádorové markery

Tumor markers

Marta Kalousová
ÚLBLD 1.LF UK a VFN
Praha

Laboratorní vyšetření u pacientů s nádorovým onemocněním

- **Krevní obraz**
- **Základní biochemie** – různé změny
(zánětlivé parametry, nutriční, metabolická – játra, kosti – Ca, tlak orgánů – ureter, nádorový rozpad – kyselina močová...)
- **Nádorové markery** – není univerzální marker
- ...

Nádorový marker

- **Substance přítomná v nádoru nebo produkovaná nádorem nebo hostitelem jako odpověď na přítomnost nádoru**
- Poskytne informaci o biologických vlastnostech a chování nádoru
- **Stanovení kvalitativní** – histopatologické, ve tkáni nádoru
- **Stanovení kvantitativní** – v séru či biol. tekutinách, dynamické sledování

Nádorové markery - historie

- 30.léta 20.století – **hCG** (fyziol. produkován placentou) objeven u mladých mužů s nádorem varlete (*Zondek*)
- 70.léta 20.století - **α_1 -fetoprotein** objeven u nádoru jater u myši (*Tatarinov*), krátce nato popsán i u lidských hepatomů (*Abelev*)
- Následně intenzivní výzkum a praktické **využití markerů v onkologii a prenatální diagnostice**
- **EGTM – European Group on Tumour Markers**

Nádorové markery

- **Solubilní markery** - klasické nádorové markery, různá chemická povaha
- **Cirkulující buněčné elementy** – cirkulující nádorové buňky, cirkulující endotelové buňky a jejich prekurzory
- **Genetické abnormality** – detekce mutací v onkogenech a tumor supresorových genech, proteinové produkty onkogenů, další změny

Chemická povaha TU markerů

- **Enzymy** – PSA, NSE, TK, LDH
- **Imunoglobuliny** – IgG, IgM, IgA, β_2 -mikroglobulin, volné lehké řetězce
- **Hormony** – růstový hormon, ACTH, TG, PRL, kalcitonin, PTH, hCG
- **Cytokeratiny** (rozpuštěné fragmenty) – tkáňový polypeptidový antigen (TPA), tkáňový polypeptidový specifický antigen (TPS), fragment cytokeratinu 19 (CYFRA 21-1)
- **Glykoproteiny, glykolipidy a sacharidy** – AFP, hCG, CEA, antigen skvamózních buněk (SCC), CA 19-9, CA 125, CA 15-3, CA 549, CA 72-4
- **Molekuly receptorové povahy** – estrogenový a progesteronový receptor, HER2/neu, EGF

Nádorové markery – klinicko-biochemické rozdělení

- **Onkofetální antigeny**
- **Tkáňově a orgánově specifické antigeny**
- **Nespecifické antigeny**

Onkofetální antigeny

- látky produkované organismem ve fetálním období či placentou, po narození se tvoří jen v souvislosti s nějakým onemocněním, zpravidla nádorovým.

Antigeny, které se objevují brzy v průběhu ontogenze, jsou postnatálně charakteristické pro méně diferencované (tj. malignější) nádory.

α_1 -fetoprotein (**AFP**)

lidský choriový gonadotropin (**hCG**)

karcinoembryonální antigen (**CEA**)

placentární alkalická fosfatasa (**PLAP**)

Tkáňově a orgánově specifické antigeny

- **fyziologicky** ve zdravé tkáni či orgánu, mimo něj pronikají jen v minimálním množství
- **patologické stavy** (nádorové onemocnění, zánět, trauma) - zvýšené uvolňování

prostatický specifický antigen (**PSA**), neuron specifická enolasa (**NSE**), protein **S-100**, rozpustné fragmenty cytokeratinů (**TPA, TPS, CYFRA 21-1**), většina **CA** antigenů definovaných pomocí monoklonálních protilátek, antigen karcinomů ze skvamosních buněk (**SCC**), thyreoglobulin (**TG**), hormony a jejich prekursory u nádorů žláz, které je fyziologicky produkují (C-peptid u insulinomu)

Nespecifické antigeny

- enzymy a hormony produkované nádory (u nádorů z orgánů, které je fyziologicky neprodukují – **paraneoplastický projev**), reakce na přítomnost TU

ferritin, laktátdehydrogenasa (**LDH**),
thymidinkinasa (**TK**), β_2 -mikroglobulin,

některé reaktanty akutní fáze,

s lipidy asociovaná kyselina sialová (**LASA**)

plicní nádory – ACTH, ADH, parathormon a další

- **AFP (α_1 -fetoprotein)** – glykoprotein podobný albuminu, fyziologicky produkován žloutkovým vakem, později fetálními játry. Využití pro dg a monitorování hepatocelulárního karcinomu a germinálních nádorů varlat a vaječníků, též v prenatálním screeningu VVV v 2.trim.
- **CEA** – skupina glykoproteinů s vysokým obsahem sacharidů, mh 180 kDa, nachází se v embryonální tkáni (střevo). Používán pro monitorování kolorektálního CA, event. jiných CA (prsů, plic), vyšší hladiny u kuřáků.
- **Lidský choriový gonadotropin (hCG)** – glykoprotein, α a β podjednotky nekovalentně vázané, α podjednotka identická s LH, FSH a TSH.
Indikace vyšetření: dg těhotenství (hCG), screening VVV (free β hCG), pro monitorování a prognózu germinálních nádorů, trofoblastické nemoci (β hCG – specifické hCG)

- **CA 125** – monitorování ovariálních karcinomů
- **CA 15-3** – monitorování nádorů prsu
- **CA 72-4** – pro monitorování CA žaludku
- **CA 19-9** – glykolipid nesoucí determinant krevní skupiny Lewis a (5% populace ho neprodukuje), pro monitorování CA pankreatu (a žlučových cest), CAVE – kontaminace slinami
- **CYFRA 21-1** – rozpustný fragment cytokeratinu 19, pro CA plic (nemalobuněčné) a močového měchýře
- **NSE** – pro monitorování malobuněčného plicního karcinomu, neuroblastomu, apudomu, CAVE – hemolýza
- **PSA** – serinová proteasa glykoproteinového charakteru, monitorování CA prostaty, CAVE - preanalytika poměr fPSA/PSA, velocita, densita

- **SCC** – antigen karcinomu skvamozních buněk, monitorování nádorů oblasti hlavy a krku, nádorů zevního genitálu a nádorů jícnu
- **TPA** – tkáňový polypeptidový antigen, směs rozpustných cytokeratinů 8, 18 a 19, monitorování karcinomů močového měchýře
- **TPS** – tkáňový polypeptidový specifický antigen, rozpustný fragment cytokeratinu 18, monitorování metastazujícího CA prsu
- **TK** – thymidinkináza, ukazatel buněčné proliferace, leukémie
- **β_2 -mikroglobulin** – hematologické malignity (NHL), vliv fce ledvin
- **Ferritin** – hematologické malignity
- **Paraprotein, volné lehké řetězce** – monoklonální gamapatie (moč Bence-Jonesova bílkovina, prožek nezachytí)

- **S100B** – maligní melanom
 - **Chromogranin A** – neuroendokrinní nádory
 - **Izoenzym pyruvátkinázy** – CA ledvin
-
- **Estrogenní receptor** – predikce odpovědi na hormonální terapii u karcinomu prsu, **stanovení ve tkáni nádoru**
 - **Progesteronový receptor** – predikce odpovědi na hormonální léčbu u karcinomu prsu, **stanovení ve tkáni nádoru**

Nádorové markery – využití dle lokalizace a typu nádoru

- **Žaludek** - CA 72-4, CEA
- **Jícen**
 - Horní třetina - SCCA (CYFRA 21-1)
 - Dolní třetina - CA 72-4, CEA
- **Pankreas** - CA 19-9, CEA
- **Játra**
 - AFP, CEA
 - cholangiocelulární - CA 19-9
 - metastázy - CEA

Nádorové markery – využití dle lokalizace a typu nádoru

- **Mléčná žláza** - CA 15-3, CEA (TPA/S)
- **Plíce**
 - SCLC - CEA, NSE (TPA/S)
 - NSCLC - CYFRA 21-1, CEA (SCC)

Nádorové markery – využití dle lokalizace a typu nádoru

- **Ovarium**
 - nemucinózní - CA 125 (TPA/S)
 - mucinózní - CA 19-9, CA 72-4 (CEA)
 - germinativní - AFP, hCG
- **Cervix**
 - epidermoidní - SCCA (CYFRA 21-1, CEA)
 - adenokarcinomy - CEA
- **Corpus uteri** - CA 125 (CEA)
- **Vulva** - SCCA

Nádorové markery – využití dle lokalizace a typu nádoru

- **Ledviny** - TPA/S, CEA (NSE)
- **Močový měchýř** - TPA/S (CYFRA 21-1)
- **Prostata** - PSA, fPSA (ChgA)
- **Testes**
 - seminomy - hCG, AFP (NSE)
 - ne seminomy - hCG, AFP

Nádorové markery – využití dle lokalizace a typu nádoru

- **Karcinoid** - 5-hydroxy, 3-indolyloctová kys., NSE
- **Štítná žláza**
 - medulární CT, CEA (NSE)
 - anaplastické TPA/S
- **Melanom** - NSE, S100beta (TK)
- **Hlava, krk** - SCCA (CYFRA 21-1)
- **CNS**
 - neuroblastomy - NSE
 - gliomy - CEA
 - astrocytomy - TK

Nádorové markery – využití dle lokalizace a typu nádoru

- **Leukemie** - TK, FER, LD
- **Lymfom**
 - hodgkinský - B2M, FER, LD
 - non-hodgkinský - TK, B2M, LD
- **Mnohočetný myelom** - B2M, paraproteiny

Stanovení nádorových markerů

- Indikace
- Preanalytika
- Stanovení – metody, interference
- Interpretace

Stanovení tumor markerů

- **Imunochemicky**
 - radioimunoanalýza – RIA, IRMA
 - enzymoimunoanalýza - ELISA, EIA, MEIA
 - fluorescenční analýza - FPIA, TRACE
 - chemiluminiscence - CLIA
- Používat stále stejnou metodu a diagnostickou soupravu od jedné firmy! (*event. rebaselining*)

Stanovení nádorových markerů - analytické interference

- Zkřížená reaktivita strukturálně podobných molekul
- Hook-efekt způsobený vysokou koncentrací markeru
- Přenos analyzovaného markeru mezi vzorky
- Interference heterofilních a lidských anti-myších protilátek (HAMA)
 - Ověřit z téhož vzorku jinou analytickou technologií

Indikace a interpretace nádorových markerů

- **Neslouží pro diagnostiku, ale pro monitorování.**
Mohou v diagnostickém procesu pomoci.
- Diagnostickou cenu má pozitivní nález tumor markerů, negativní nález ovšem neznamená nepřítomnost nádoru!!!

Pro diagnózu je vždy rozhodující histopatologické vyš. doplněné o průkaz TU markerů.

Přechodné zvýšení tumor markeru – zánět, nezhoubný nádor, trauma, po nasazení účinné terapie, při postižení jater nebo ledvin u markerů, které jsou takto eliminovány

- **Screening** – stolice na OK, PSA zatím ne
u specifických skupin – kalcitonin v rodinách s medul. CA štítné žlázy, CA 15-3 u mutací BRCA

Indikace a interpretace nádorových markerů

- **Dynamika změn** (zvýšení, i když v referenčních mezích, může dříve upozornit na recidivu než zobrazovací metody – CT, UZ, PET)

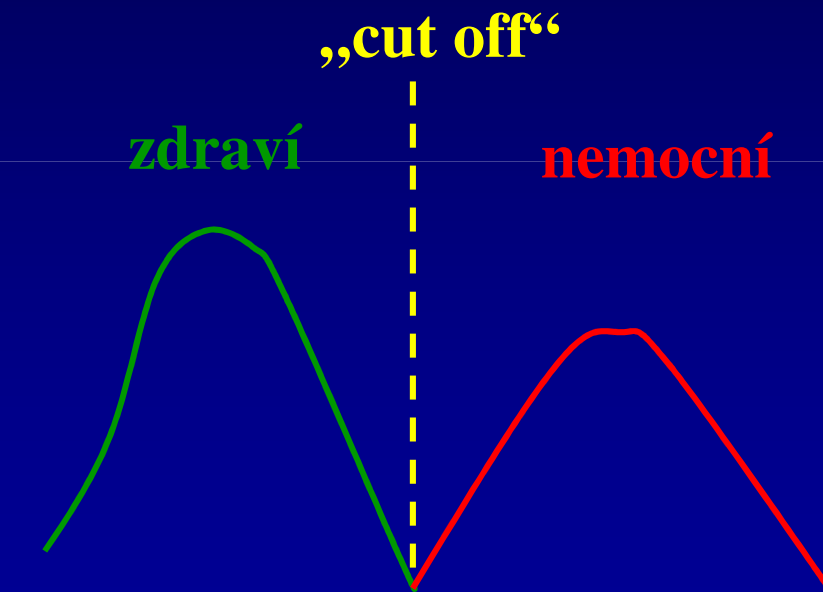
významný je vzestup ve 3 za sebou následujících odběrech, nárůst o více než 25%

TU marker může odhalit nádor o hmotnosti 1 mg (10^6 maligní buněk), klinická dg při 10^9 maligních buněk

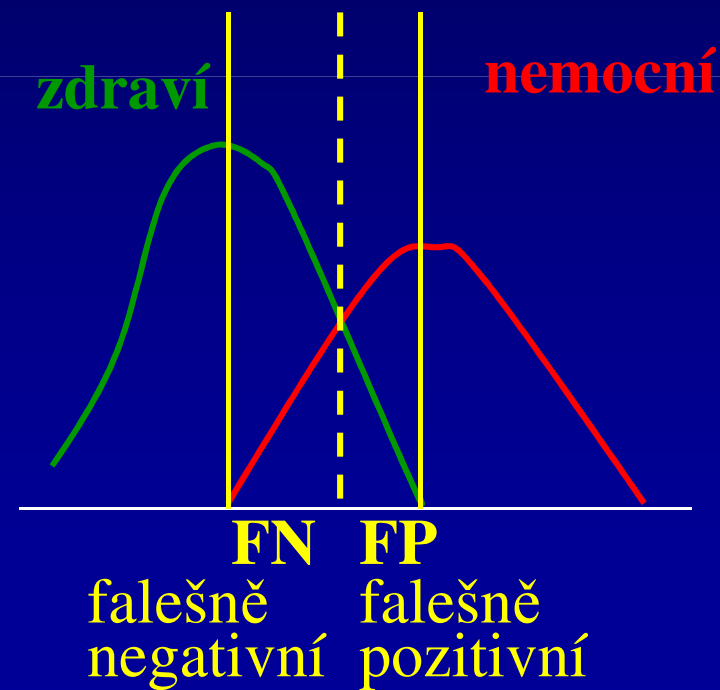
- **Systematické vyšetření** – opakované vyšetření po operaci, interval zpočátku častěji, následně cca 3-6 měsíců)
- **Sledování více tumor markerů** – větší pravděpodobnost záchytu nádoru

Hodnocení TU markerů

- Ideální situace



- Realita



Hodnocení TU markerů

- **Specificita** = $SN / (SN + FP)$
*pravděpodobnost, že negativní test znamená negativní dg
správná negativita u zdravých jedinců*
- **Sensitivita** = $SP / (SP + FN)$
*pravděpodobnost, že pozitivní test vyjadřuje pozitivní dg
správná pozitivita u jedinců s chorobou*
- **Positivní prediktivní hodnota** = $SP / (SP + FP)$
- **Negativní prediktivní hodnota** = $SN / (SN + FN)$

SP – počet správně pozitivních vyšetření

SN – počet správně negativních vyšetření

FP – počet falešně pozitivních vyšetření

FN – počet falešně negativních vyšetření

Hodnocení TU markerů pomocí ROC křivek

(*ROC = receiver operating characteristic, rozhodovací operační křivka*)

senzitivita (%)

100 %

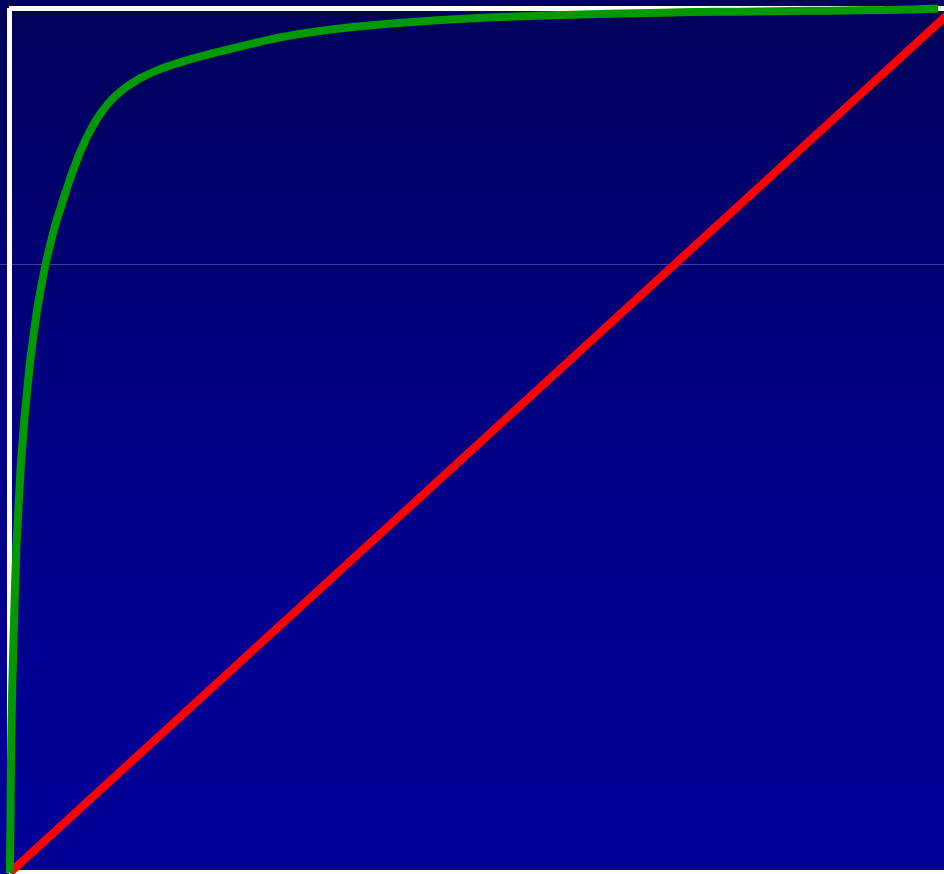
0 %

100 %

0 %

specificita (%)

- vhodný TU marker
- žádná diskriminace mezi zdravými a nemocnými



Ideální marker

- **Vysoká specificita** – nevyskytuje se u jiných nenádorových onemocnění a u zdravých osob
- **Vysoká senzitivita** – měřitelný na začátku onemocnění
- **Orgánově specifický**
- **Korelace s nádorovou masou a s prognózou**

zatím neexistuje

Příklad

CEA pro kolorektální CA

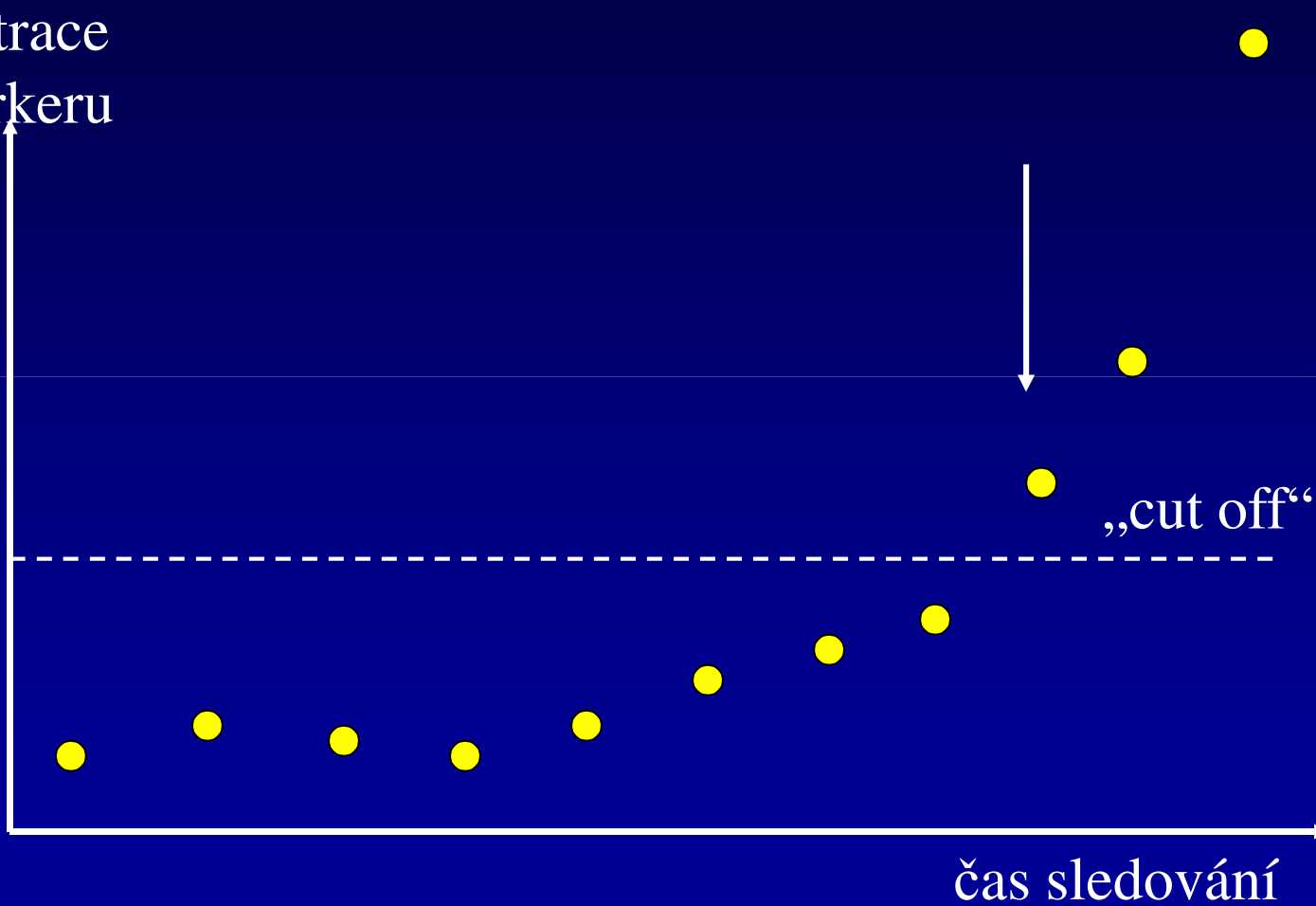
- 95% specificita – tzn. označí nesprávně 5% vyšetřovaných jako nemocné
- 70% senzitivita – tzn. nezachytí 30% nemocných

Interpretace výsledků TU markerů

- Dříve – porovnání s referenčním rozmezím
- Dnes dopor. **určení individuální hladiny** (koncentrace TU markeru ve „stabilizovaném“ stavu, tj. po operaci - odstranění nádorové masy) a následné **dynamické sledování**

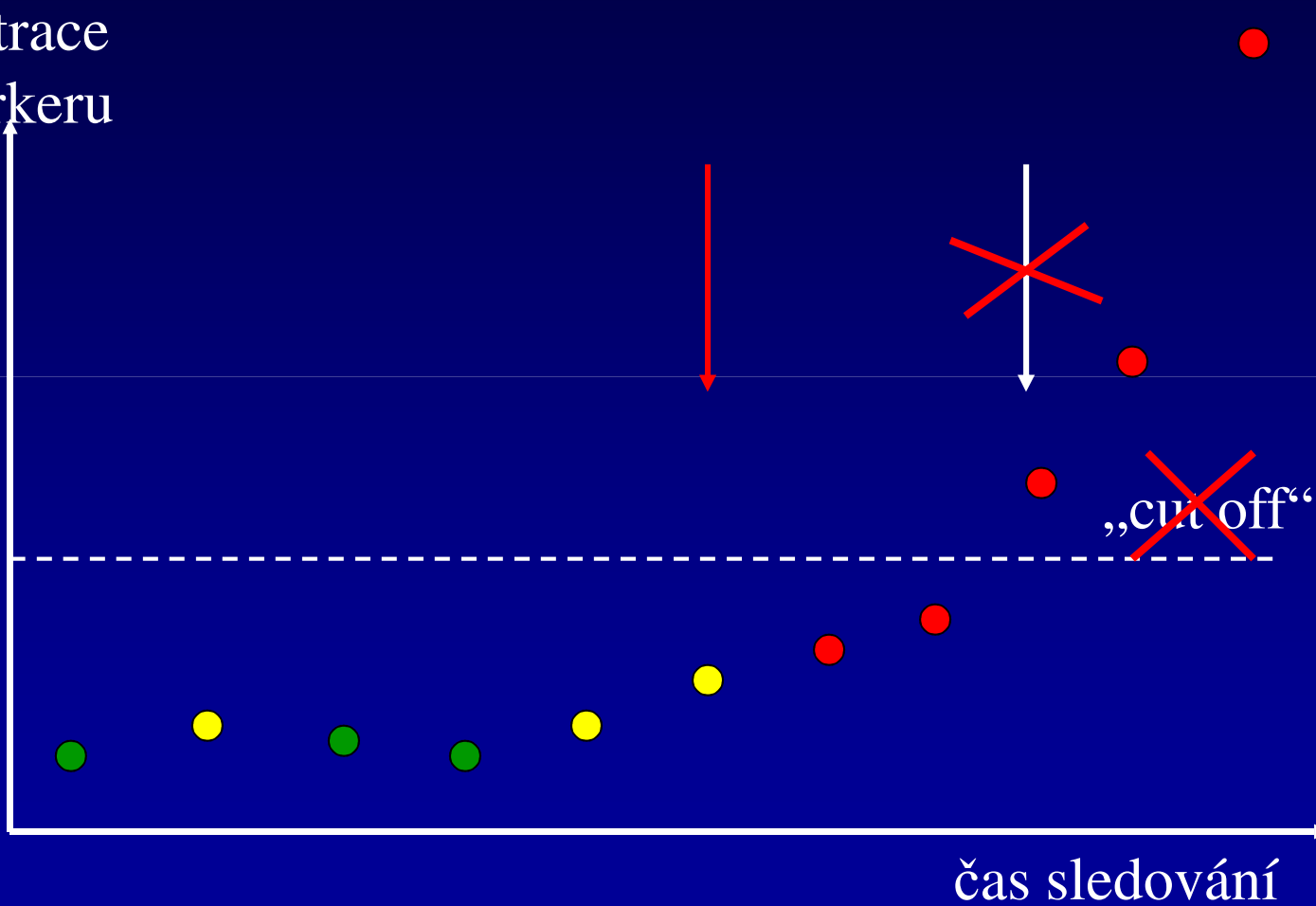
Dynamické sledování

koncentrace
TU markeru
v krvi



Dynamické sledování

koncentrace
TU markeru
v krvi



Význam molekulární biologie v diagnostice nádorových onemocnění

- Nádory - mutace genů, jejichž produkty regulují buněčnou proliferaci, vývoj, diferenciaci a zánik buněk
- Onkogeny a antionkogeny

Onkogeny a jejich význam u nádorů - příklady

- **abl** → tyrosin-proteinkinasa (leukémie)
- **erb B1, B2** → receptory epidermálního růstového faktoru
- **c-myc** – transkripční faktor (lymfomy)
- **neu(erbB-2)** → receptor epidermálního růstového faktoru (CA prsu)
- **NF1** – nukleární faktor
- **ras** → GTP-asu aktivující protein

Antionkogeny a jejich význam u nádorů - příklady

- **BRCA 1 a BRCA 2** – opravy defektů DNA (CA prsu a ovaria)
- **p53** – regulace buněčného cyklu
- **RB1 a RB2** – regulace buněčného cyklu (retinoblastom)

Potenciální nové tumor markery

Proteiny a onkoproteiny – produkty mutovaných genů, které mají význam pro přežití buněk, jejich dělení, diferenciaci a metastazování

- **Regulace buněčného cyklu** - cykliny
- **Apoptóza** – Bcl-2 protein, sFas, protein-produkt mutovaného genu p53
- **Signální transdukce** - c-erbB-2 (Her-2/neu), EGRF, IGF, TNF- α
- **Adheze** - ICAM-1, VCAM-1
- **Angiogeneze** – inhibitory angiogeneze - angiostatin, angiogenin, trombospondin
- **Markery spojené se specifickými vlastnostmi nádorových buněk** – matrix metalloproteinasy, aktivátor plasminové urokinasy (uPA) a její inhibitor (PAI-1)

Nové a potenciální nádorové markery

- Volná DNA v plasmě (prokazatelné též mikrosatelitní změny)
- Volná mRNA v plasmě
- Enzymy syntézy DNA ve tkáňových vzorcích
- Mammaglobin - CA prsu
- Heparanáza
- Další

Doporučená literatura

- Zima T. : Laboratorní diagnostika. 2.doplněné a přepracované vydání. Galén Karolinum Praha 2007, 906 s.
- Kalousová M. a kol.: Patobiochemie ve schématech. Praha Grada Publishing 2005, 264 s.
- Doporučení ČSKB – www.cskb.cz
- Doporučení EGTM – www.egtm.eu