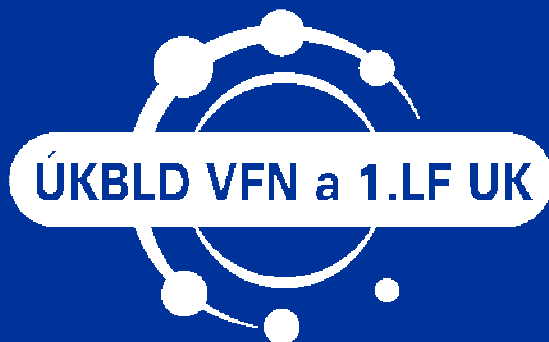


# Patobiochemie rakoviny

## Nádorové markery

Drahomíra Springer

ÚKBLD VFN a 1.LF UK Praha 2



# Rakovina

Výsledek genetické mutace – série náhodných událostí

Zárodečná mutace – vzniká při vývoji v zárodečné buňce, celý organismus se vyvine s danou mutací

Somatická mutace – jen u některých tělních buněk  
–vznik rakoviny

Spontánní mutace až  $10^6$  denně.

K vývoji nekontrolovatelného bujení je třeba 5-6 na sobě nezávislých mutací.

# Nejčastější solidní nádory u českých žen

1. nádory prsu
2. nádory tlustého střeva a rektu
3. nádory těla děložního
4. nádory vaječníků
5. nádory hrdla děložního
6. plicní nádory
7. nádory žaludku
8. nádory ledvin
9. nádory žlučníku
10. melanomy (typ nádorů kůže)

# Úmrtnost na nádory u žen

1. plicní nádory (18 %)
2. nádory prsu (18 %)
3. nádory tlustého střeva (15 %)
4. leukemie (nádory bílých krvinek)
5. nádory slinivky

# Nejčastější solidní nádory u českých mužů

1. plicní nádory
2. nádory tlustého střeva a rektu
3. nádory prostaty
4. nádory ledvin
5. nádory močového měchýře
6. nádory žaludku
7. nádory slinivky
8. melanomy (typ nádorů kůže)
9. nádory hrtanu
10. nádory jater

# Úmrtnost na nádory u mužů

1. plicní nádory (35 %)
2. nádory tlustého střeva (12 %)
3. nádory prostaty (10 %)
4. leukemie (nádory bílých krvinek)
5. nádory slinivky

# Dědičnost rakoviny

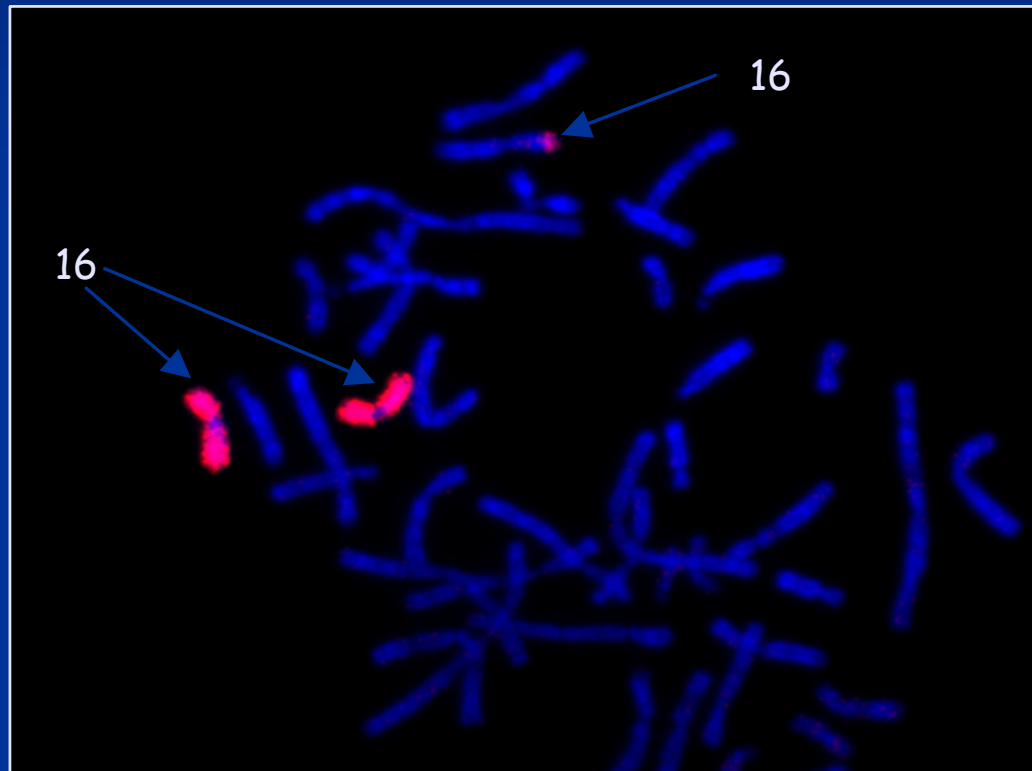
- rakovina není dědičná obvyklou mendelovskou dědičností
- dědičná může být např. jedna mutace tumor supresorového genu - potomstvo je tedy o jeden krok blíže k vypuknutí rakoviny
- 15% kolorektální rakoviny obsahuje již zděděné mutace, řada z nich zasahuje geny produkující proteiny opravující DNA

# Nádorová transformace

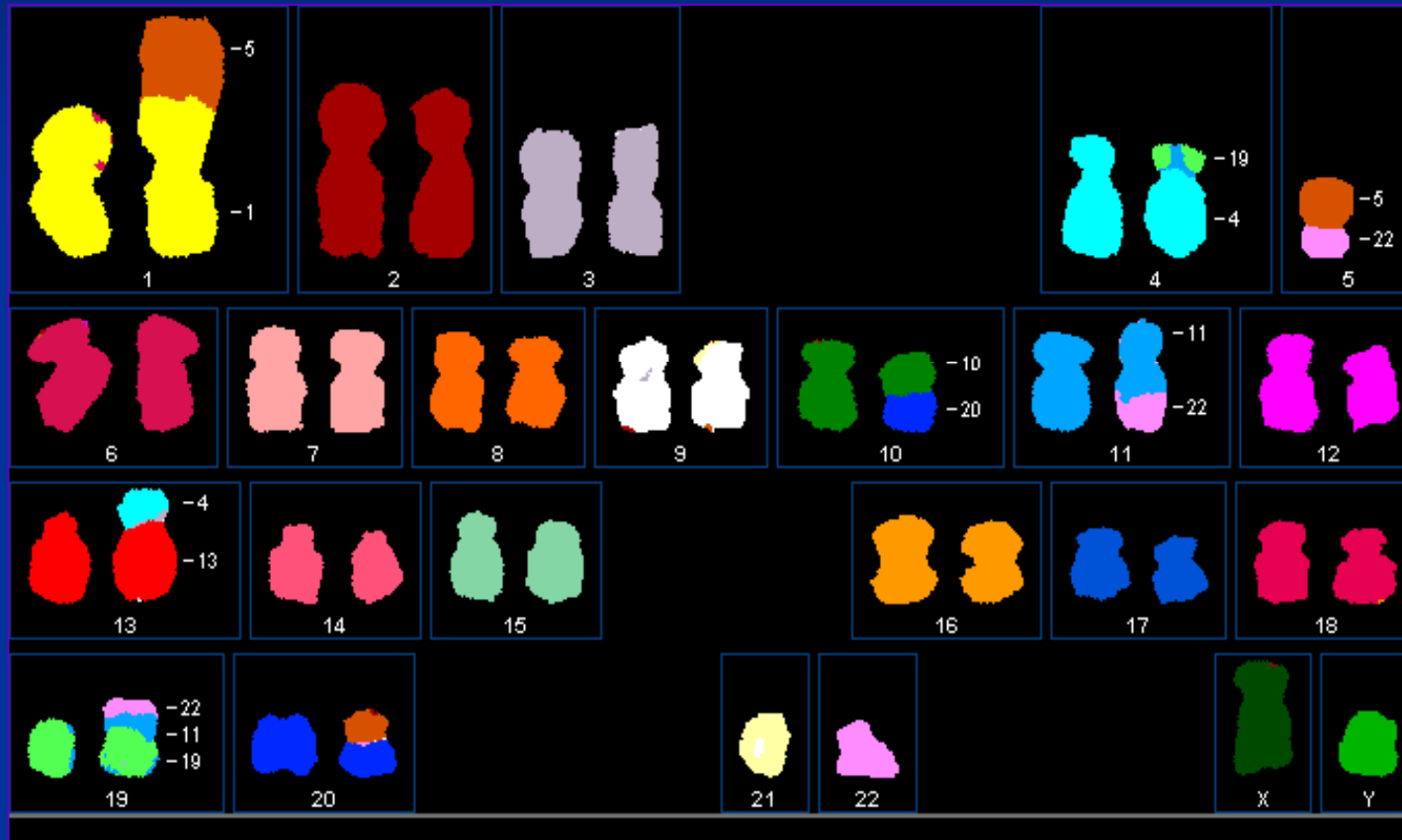
- Mutace postihují geny signálních drah, kontrolních bodů buněčného cyklu, buněčné diferenciace, apoptosy, reparace DNA...
- V průběhu buněčných dělení jedné kmenové populace nastává postupná akumulace několika mutací v uvedených skupinách genů, které resultují v její nádorovou transformaci.



# Přestavba chromozomu

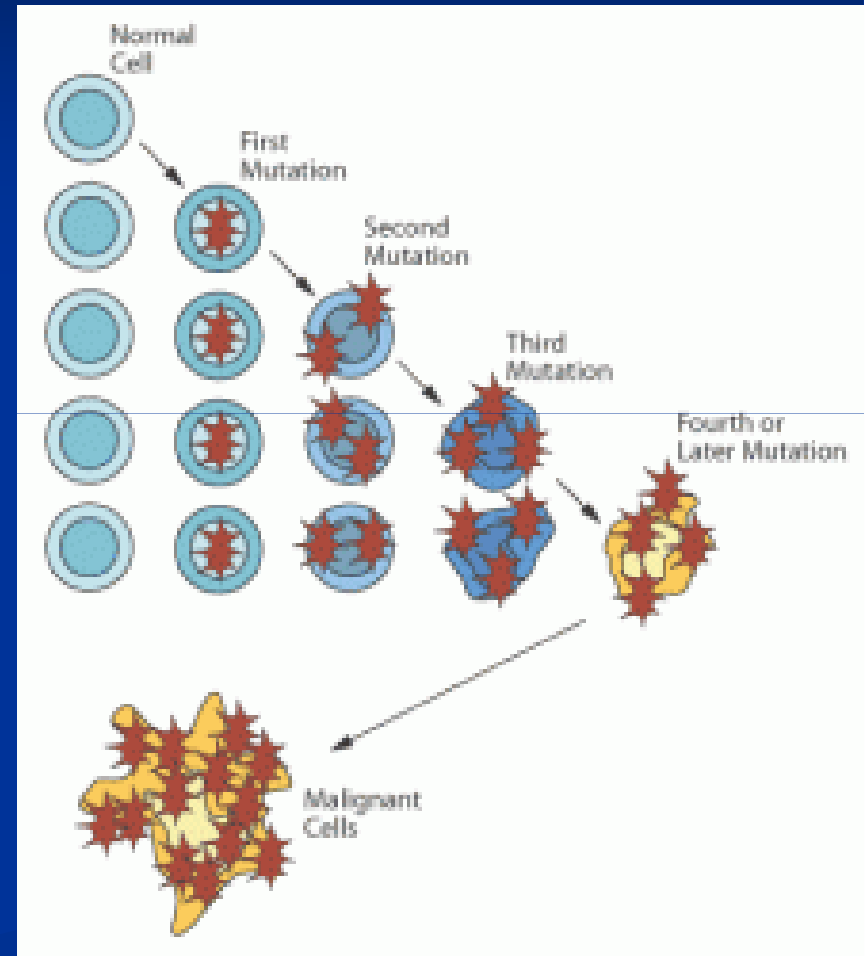


# Přestavba chromozomu



# Rakovina

- Normálně je rovnováha mezi buněčným dělením a buněčnou smrtí regulována - zajištění integrity organů a tkání
- Mutace vedoucí k rakovině narušují tuto rovnováhu



# Změna protoonkogenu na onkogen

- Maligní buňky mají často chromozomové translokace, díky kterým se dostávají protoonkogeny do blízkosti silných promotorů a jsou přepisovány častěji. Jindy je to promotor, který se přesune do blízkosti protoonkogenu
- mutace může způsobit, že protein je více aktivní nebo více odolný vůči degradaci

# Funkce celulárních onkogenů

- Onkogeny kódující transkripční regulační faktory
- Onkogeny kódující proteinkinázy (intracelulární a transmembránové) a receptory růstových faktorů
- Onkogeny kódující růstové faktory
- Onkogeny kódující signální transduktory
- Onkogeny inaktivující nádorové supresory
- Onkogeny blokující apoptózu

# Protoonkogeny

- rakovina vzniká poškozením genů kontrolujících buněčný růst a dělení, a to buď fyzikálními nebo chemickými agens (mutageny, X-zářením atd.)
- protoonkogen = gen, který stimuluje normální buněčný růst a dělení
- onkogen = gen, který způsobuje rakovinu

onco = řec. tumor, nádor

# Proliferační geny

- Kódují proteiny důležité pro růst a diferenciaci
- Pouze jeden gen (protoonkogen)
- V případě jejich abnormální aktivace - chybná exprese nebo jejich kvalitativní změna – mutace – onkogeny

# Proliferační geny

## ■ Aktivace

Bodová mutace

Amplifikace (zmnožení) genu

Delece (ztráta části sekvence DNA) genu

Přestavba chromozomu

Inzerční mutageneze



# Ras protein

- jedná se o tzv. G protein (aktivovaný GTP), který je součástí dráhy, předávající signál růstového faktoru přes celou cytoplasmu až do jádra
- normálně je dráha spuštěna růstovým faktorem
- mutovaný ras protein spouští dráhu i v nepřítomnosti růstového faktoru

# Ras protein

- Mutace ras proteinu až u 30% karcinomů
- Aktivovaný ras protein aktivuje dráhu tyrozinkináz vedoucí k růstu buněk
- Aktivní ras s navázaným GTP
- Neaktivní ras s navázaným GDP (konverze pomocí GTPázy)
- Regulace exprese genu – změny v komplexním chování buněk – **proliferace a difenciace**

# Antiproliferační geny

- Kódují proteiny, které se uplatňují jako brzdy zastavující buněčný cyklus v jeho kontrolních bodech
- Zabraňují abnormální proliferaci a přenosu poškozené genetické informace
- Označováné jako tumor-supresorové geny
- Nádorové supresory mají recesivní charakter – nutný defekt obou alel

# Tumor supresorové geny

- translační produkty těchto genů normálně pomáhají zastavit nekontrolovatelný růst
- translační produkty tumor supresorových genů mají normálně v buňce různé úkoly:
  - opravují poškozenou DNA
  - kontrolují adhezi buněk k sobě či k extracelulární matrix
  - jiné přímo inhibují buněčný cyklus

# Nádorové supresory - přehled

- p53
- pRb
- NF-1
- NF-2
- APC
- WT-1
- PTEN
- BRCA 1,2
- p16<sup>INK4</sup>

# Důsledky defektu

- Defekty WT1 – Wilmsův nádor ledviny
- Defekty PTEN – četné nádory v pokročilých stádiích vývoje (glioblastomy, melanoblastomy, atd.)
- Defekty BRCA 1 – predispozice a familiární výskyt karcinomů mléčné žlázy, ovaria a pravděpodobně prostaty a tlustého střeva
- Defekty BRCA 2 – navíc predispozice ke karcinomu pankreatu a hrtanu

# APC

- **Mutace APC – familiární adenomatózní polypóza (FAP) tračníku – vysoký potenciál malignizace**
- **Tento gen se chová dominantně – k projevům dochází i při mutaci jedné alely!**

# p53

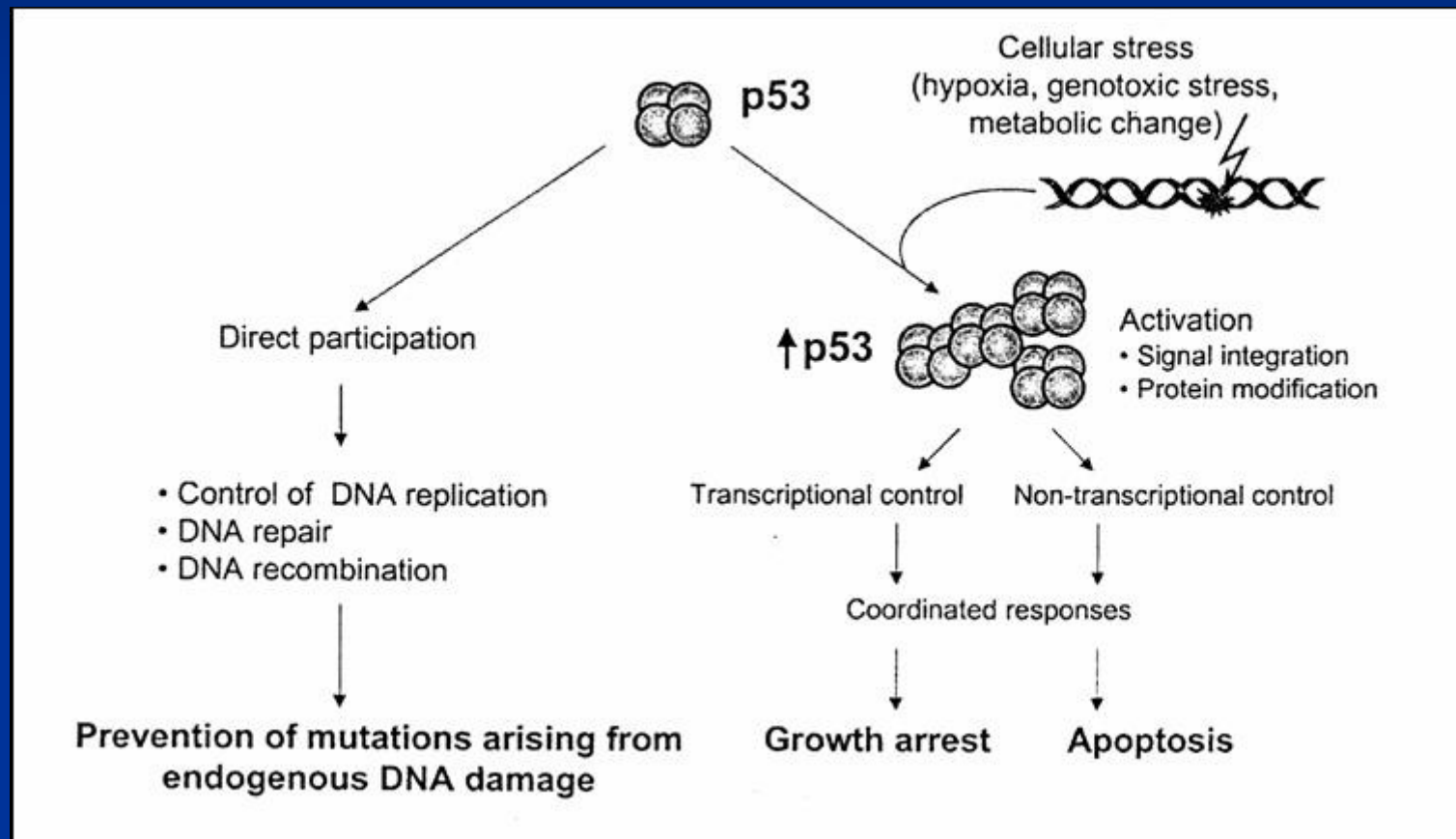
*„Guardian of genome“, molekula roku 1992*

- je tumor supresorový protein o hmotnosti 53 000 Daltonů
- p53 je transkripční faktor, který stimuluje syntézu proteinů inhibujících růst buňky:
  - aktivuje gen p21, jehož proteinový produkt se váže k cyklin-dependentním kinázám, čímž je získán čas pro opravu DNA
  - aktivuje geny, jejichž proteiny opravují DNA
  - pokud je DNA neopravitelná, aktivuje „sebevražedné“ geny, které rozběhnou apoptózu
- **Defekty p53 v lidských nádorech patří mezi nejčastější (mutace obou alel)**
- **Mutace – somatické buňky i germinální buňky**



# Funkce p53

(převzato z *Cell. Mol. Life Sci.*, Vol 55, p 22, 1999)



# Rakovinu způsobí až mnohonásobná mutace

- tumor supresorové alely jsou většinou recesivní - musí tedy zmutovat obě
- naopak poliferační onkogeny jsou většinou dominantní - stačí, aby zmutovala jedna
- nakonec je aktivován gen pro telomerázu

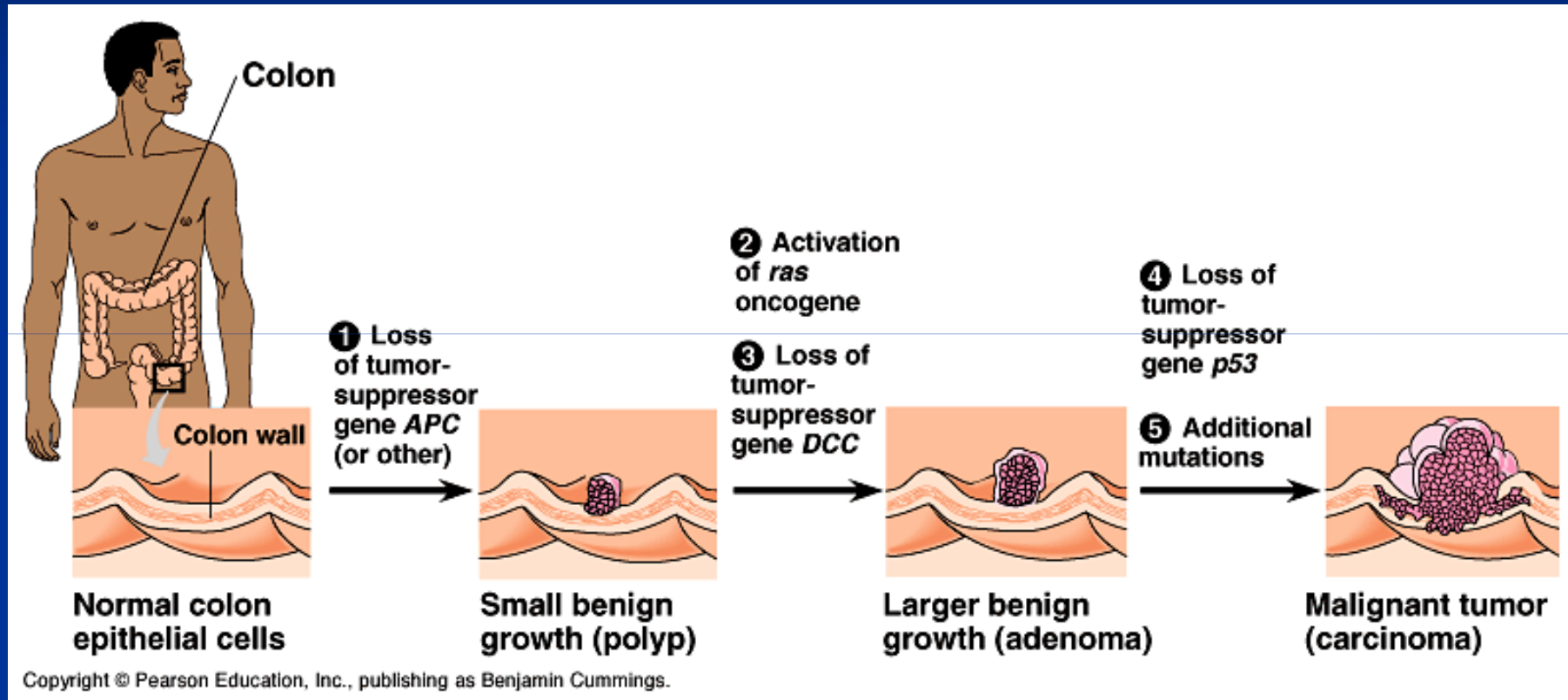
# Nádory prsu

- Jen přibližně 5 - 10 % žen s nádory prsu má dědičnou formu onemocnění.
- Geny, jejichž mutace lze v postižených rodinách nalézt: *MSH2/MLH1*, *TP53*, *PTEN*, *STK11*, *BRCA1* a *BRCA2*.
- Největší klinický význam mají mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2*.
- Četnost mutací genů *BRCA1* a *BRCA2* je rozdílná u různých etnických skupin a v různých geografických regionech.
- Rizikové rodiny v Německu a Nizozemí - kolem 20%, v Izraeli 47 %, v Rusku v 79 % a u Askenazi židů až 85 %.

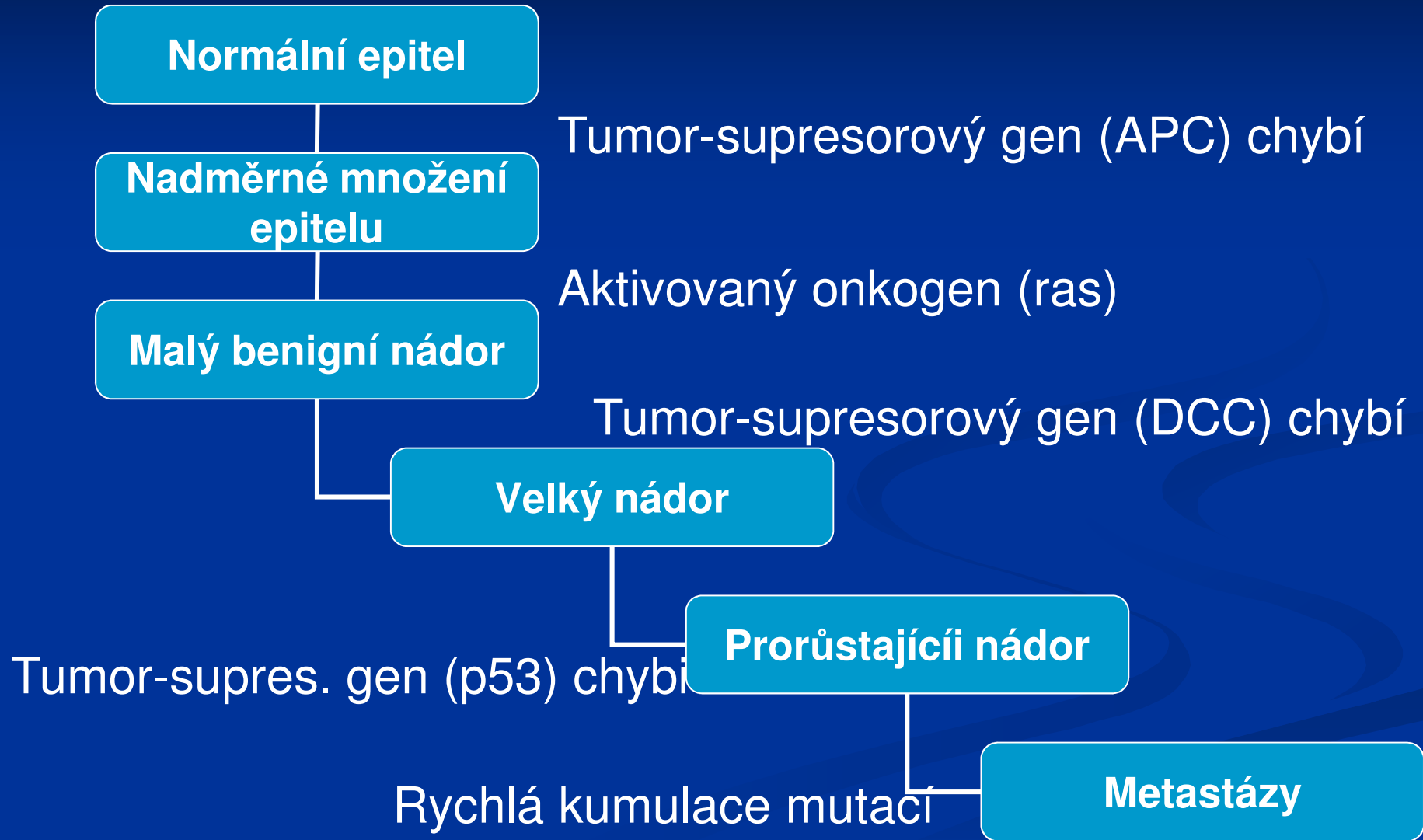
# Kolorektální karcinom

- kolorektální karcinom - nejrozšířenější malignita v ČR
- nejprve vzniká polyp, tvořený „normálními“ buňkami, které se jen rychleji dělí
- tumor roste a může se stát maligním - v jeho buňkách se hromadí mutace tvořící onkogeny a knock-outované tumor supresorové geny

# Rakovina tlustého střeva

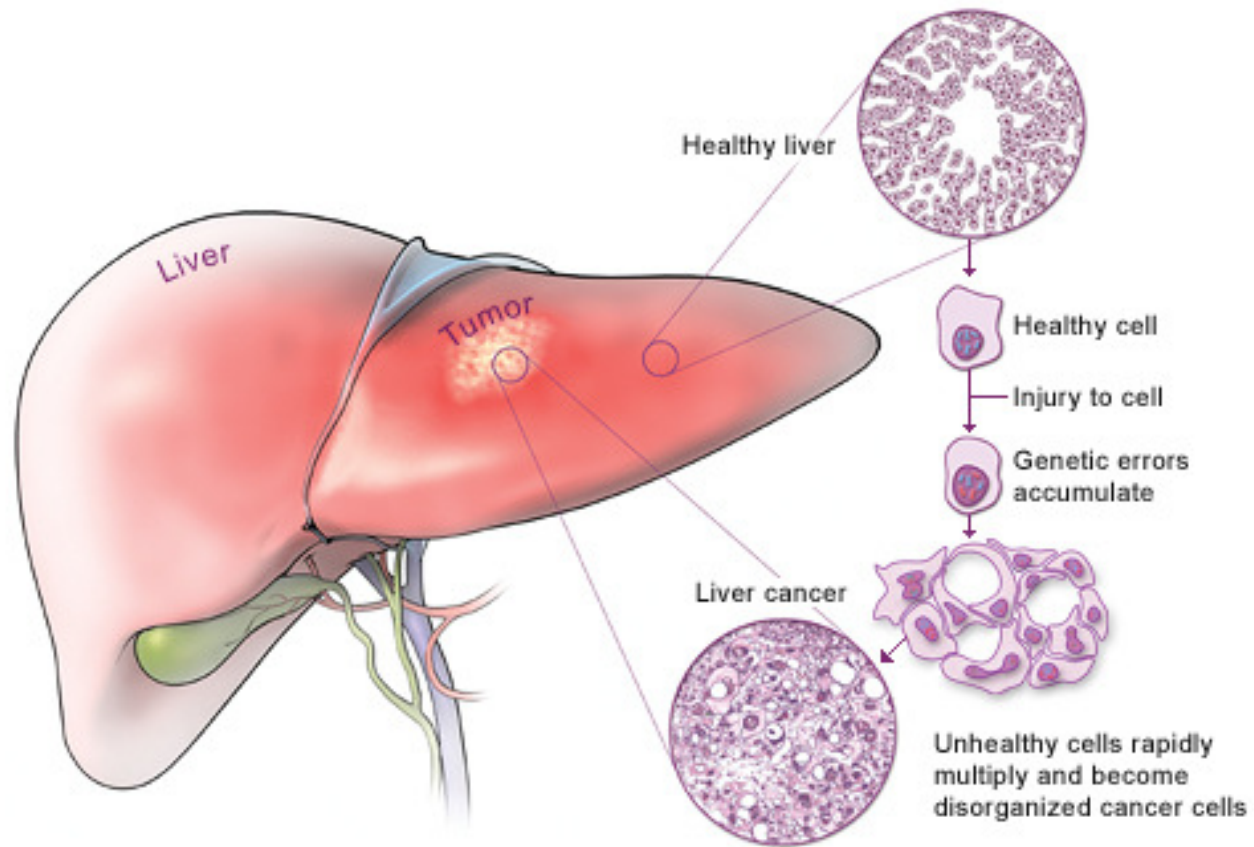


# Vznik kolorektálního karcinomu (10-20 let)



# Vznik rakoviny

## Genetic mutation and cancer development



# Rakovina

Charakterizována kombinací dvou poruch

1. Buňky se množí i bez signálu k dělení
2. Buňky kolonizují i oblasti vyhrazené pro jiné buňky

Samotná 1. – benigní nádor – lze dobře operovat

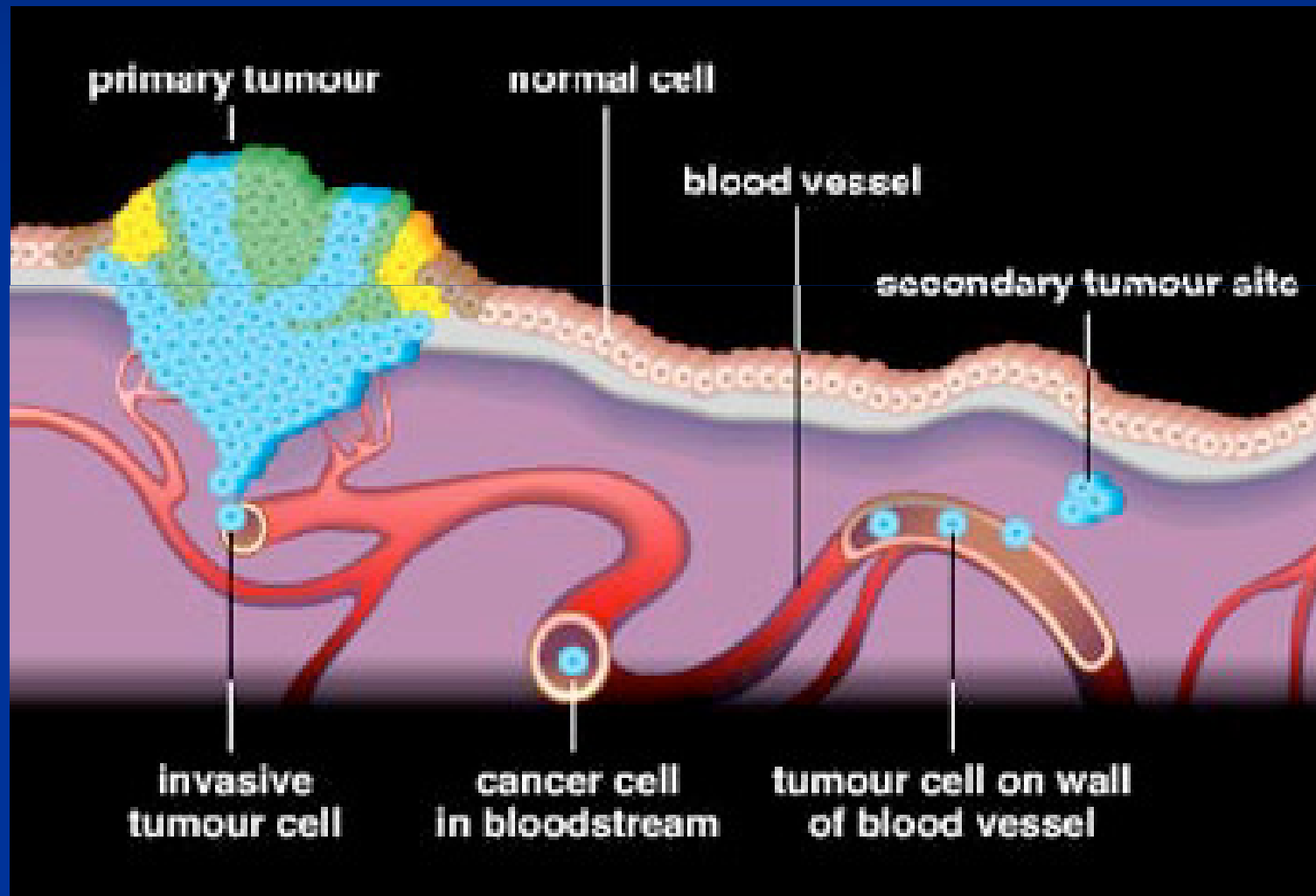
Kombinace 1.a 2. – tvoří se metastázy



# Vlastnosti rakovinných buněk

- dokáží se vyhnout apoptóze
- mohou se neomezeně dělit (jsou imortalizované)
- samy si vytvářejí potřebné růstové faktory
- jsou necitlivé na inhibitory růstu
- mají zvýšenou rychlost buněčného dělení
- mají změněnou schopnost diferenciaci
- neschopnost kontaktní inhibice
- mají schopnost napadnout sousední tkáň
- mají schopnost budovat metastáze ve vzdálených místech
- mají schopnost podpořit růst cév (angiogeneze)

# Vznik metastáz



# Typy rakoviny

- Karcinomy - z epitelní (kožní) buňky, digestivního traktu nebo žláz
- Leukémie začíná v buňkách kostní dřeně
- Lymphoma je rakovina z lymfatické tkáně
- Melanoma vzniká v melanocytech
- Sarkoma začíná ve spojovací tkáni kostí nebo svalů
- Teratoma začíná v zárodku buněk

# Nádory podle tkáně vzniku

- **Nádory z pojivové a krvetvorné tkáně (mezenchymální nádory)**
- nádory z tukové tkáně (např. lipom), z vaziva (např. fibrom), z řídkého hlenovitého vaziva (myxom) a nádory z cév (hemangiom)
- nádory z hladké či příčně pruhované svaloviny (leiomyom, rabdomyom), z chrupavky (chondrom) a z kostní tkáně (osteom)
- nádory z krvetvorné tkáně – leukemie a hemoblastomy (jejich podskupinou jsou lymfomy)

# Nádory podle tkáně vzniku

- **Nádory z krycí tkáně (epitelové nádory)**
- nádory z výstelky – papilom a karcinom
- nádory z tkáně žláz – adenom a adenokarcinom
- nádor krycích blan – mezoteliom

# Nádory podle tkáně vzniku

- **Nádory nervového původu (neuroektodermální nádory)**
- nádory z nervových uzlů – gangliocytem, feochromocytem a neuroblastom
- nádory z podpůrných buněk – např. neurinom a astrocytom
- nádory z pigmentových buněk v kůži – pigmentový névus a melanom

# Nádory podle tkáně vzniku

- **Nádory smíšené**
- nádory ze smíšených tkání – buď prostě smíšené (např. fibroadenom), či napodobující určitý orgán (neuroblastom, hepatoblastom)
- nádory ze zárodečných buněk (germinální nádory) – seminom, teratom, embryonální karcinom a další

# Mutace

- Všechny mutace se neprojeví naráz – hromadění mutací – nádory jsou typické pro starší věk
- Vrozené mutace (BRCA1, BRCA2..) – časnější vznik rakoviny
- Rakovina pochází z jediné buňky - může být klasifikována typem buňky, ve které vznikla, a její lokalizací.



# Kancerogeneze

Etapovitý proces vzniku nádoru:

- 1. iniciace – první genetická změna, která se přenáší na další potomstvo původní buňky, ještě opravitelné změny genetické informace
- 2. promoce – další změny iniciací pozměněných buněk, změny již nevyhnutelně vedou k nádoru
- 3. progrese – aktivace různých genů vedoucí k neregulovatelnému chování buněk

# Kancerogeneze

Podle toho, v jaké fázi působí, se kancerogeny popisují jako iniciátory a promotory

- - iniciátory – jsou genotoxické
- - promotory nejsou genotoxické (peroxydy, katecholaminy, nitrofurany, chronické dráždění)

# Fyzikální karcinogeny

## Ionizující a neionizující (UV) záření

- neionizující záření je součástí normálního světla, přirozené ionizující záření má zdroj v zemském podloží, ve slunečním a kosmickém záření
- přenos energie vede k přímému poškození DNA, nejčastěji formou zlomů na chromozomech, nebo vede k ionizaci vody a k nepřímému poškození volnými radikály

# Chemické karcinogeny

- nejnebezpečnější – PAU (benzpyren, benzantracen...), nitrosaminy (uzeniny, smažené jídlo)
- detoxikace PAU - glutathion-S-transferasa - polymorfni - u 50% bělochů chybí - tito lidé mají při styku s cigaretovým kouřem mnohem vyšší riziko ca plic a měchýře
- volné radikály
- metabolity alkoholu
- anorganické látky – arzen, nikl, chrom, těžké kovy

# Biologické kancerogeny

- Aflatoxin – nádory jater (mutace p53), hlavně v Číně a v Africe (aflatoxin B1),
- Chronický zánět –
  - granulocyty vylučují velké množství volných radikálů

# Viry a vznik rakoviny

- 15 % všech rakovin je virového původu
- Mají schopnost získat hostitelský gen
- Genom karcinogenních virů obvykle obsahuje nějaký onkogen nebo gen inaktivující tumor-supresorový gen
  - Viry mohou i aktivovat protoonkogen

# Viry

- **Retroviry** způsobují leukémie
- **Herpesviry** - viry hepatitidy - způsobují rakovinu jater
- **Papilomaviry** způsobují rakovinu děložního hrdla
  
- Transformační viry – způsobují rakovinu
  - Většinou u zvířat (kuřecí sarkomy...)
  - U lidí výjimečně

Přispěly k objevům principu vzniku rakoviny

# Retroviry

- 1911 - Rous – přenosný sarkom u kuřat
- Etiologické agens – retrovirus (RSV)
- Retrovirus
  - RNA virus
  - Reverzní transkriptáza (Temin, Říman) – přepis z RNA do hostitelské DNA
  - Inkorporovaný virus – provirus
  - Geny viru schopné indukovat nádorovou transformaci – virové onkogeny – sekvenčně identické s některými geny u savců
- **Retrovirové onkogeny**
  - Akutně transformující viry
  - Pomalu transformující viry (inzerční mutageneze)



# Epigenetické změny

- před mutacemi dochází u postižených buněk ke změnám epigenetickým
- Většinou jde o připojení metylových skupin na konkrétní místa genů - „ztluštění“ vlákna DNA, které znemožňuje správné čtení kódu
- některé geny kompletně zapnou nebo vypnou, nebo jen mírně oslabují jejich činnost
- kritický bod pro vznik rakoviny

# Vývoj nádoru

- epigenetické rozvrácení buněk, které zajišťují obnovu tkání. Změní se normální regulace genů - populace množících se buněk
- nastartování mutací uvnitř této populace rozvrácených buněk v jejich časných stádiích růstu, kdy dochází k přestavbě chromozómů
- genetická a epigenetická nestabilita, která vede k šíření nádorové tkáně

# Epigenetické změny

- Sledování těchto nepatrných úprav vlákna DNA by mělo lékařům pomáhat zahájit preventivní léčbu nádorů ještě před tím, než k mutacím dojde
- Je sice pravda, že lidský genom již byl kompletně přečten, ale v tomto případě nám to je platné asi jako mrtvému zimník

# Diagnostika nádorů

- V časném stadiu jsou pacienti bez příznaků
- Diagnostický práh onkomarkerů umožňuje v příznivých případech odhalit nádor o hmotnosti 1 mg, tedy asi  $10^6$  maligních buněk
- Běžnými diagnostickými metodami (RTG, CT, mammograf) se odhalí tumor, který obsahuje nejméně  $10^9$  buněk, tedy nádor v průměru 1 cm - riziko je už 25%
- Nádor této velikosti je schopen metastazovat

# Proteomika

- Proteomika se zabývá globálním hodnocením exprese genetické informace na úrovni bílkovin (proteomem)
- Obor snažící se identifikovat všechny bílkoviny, které jsou v tkáni
- Cíl - objevit proteinové biomarkery rakoviny
  - Možnost včas a spolehlivě vyhledat karcinom
- Techniky –
  - Dvojměrná elektroforéza
  - Hmotnostní spektrometrie (MS1)
  - Tandemová MS2 pro identifikaci jednotlivých vhodných proteinů

# Primární prevence

- objektem je celá společnost a její životní prostředí, snažíme se ovlivnit incidenci
- riziko hledáme – v genetice, v životním prostředí a v životním stylu
- hlavní zevní vlivy na karcinogenezi – strava (36%), tabák (31%), infekce (11%), sexuální chování (7%), pracovní prostředí (4%), alkohol, znečištění ovzduší, medicína aj.
- zasahujeme hlavně v oblasti životního stylu – kouření, strava, tělesný pohyb

# Sekundární prevence

sledujeme přednádorové stavy nebo se snažíme co nejdříve detekovat nádor

- snažíme se tedy ovlivnit mortalitu
- podílí se na tom nejen lékař, ale i veřejnost (samovyšetřování apod.)
- důležitým prostředkem sekundární prevence je screening

# Screening

v současné době u 3 tumorů –

- ca čípku – gynekologické vyšetření, stěry na cytologii, detekce HPV
- mamografický screening
- screening na kolorektální ca – okultní krvácení po 50. roce, jednou za rok

Zásady screeningu – nemoc musí být častá v populaci

- dobře definované přednádorové stavy nebo neinvazivní stádia
- vysoce specifické metody, jednoduché a levné
- průkaz snižování incidence a významu



# Kdo by měl být testován

- **Nemocné osoby bez rodinného výskytu nádorů:**
  - Karcinom prsu nebo vaječníků diagnostikovaný u ženy do 35 let věku
  - Karcinom prsu u muže vzniklý v kterémkoliv věku po vyloučení jiné příčiny (např. Klinefelterův syndrom - XXY)
  - Výskyt nádoru prsu a vaječníků u jedné osoby
  - Oboustranný karcinom prsu, první diagnostikován do 40 let věku
  - Medulární karcinom prsu +/-

# Kdo by měl být testován

- **Nemocné osoby s rodinným výskytem nádorů:**
  - Dvě příbuzné prvního stupně (přes otce druhého stupně) s nádorem prsu nebo s nádorem vaječníků, alespoň jedna diagnostikována ve věku pod 50 let
  - Tři a více karcinomů prsu nebo vaječníků u příbuzných prvního i druhého stupně v jedné linii bez věkové limitace
- **Zdraví rodinní příslušníci pozitivně testovaných osob, muži i ženy, od 18 let věku.**

# Nádorové markery

# Nádorové markery

- Látky, jejichž stanovení v tkáni nádoru (*kvalitativní*) nebo v krevním séru či jiných biologických tekutinách (*kvantitativní*) pacienta s neoplastickým onemocněním **poskytne informaci o biologických vlastnostech a chování nádoru**

*kvalitativní* histopatologické stanovení – upřesnění dg, podklad pro výběr vhodných markerů

*kvantitativní* stanovení – sledování progresu, regrese → prognóza, terapie

# Využití nádorových markerů

- Diagnostický práh onkomarkerů umožňuje v příznivých případech odhalit nádor o hmotnosti 1 mg, tedy asi  $10^6$  maligních buněk
- Běžnými diagnostickými metodami (RTG, CT, mammograf) se odhalí tumor, který má nejméně  $10^9$  buněk, tedy nádor v průměru 1-2 cm
- Nádor této velikosti je schopen metastazovat

# Historie

- První pozorování 30.léta 20.století – **choriový gonadotropin** (fyziologicky produkován placentou) objeven u mladých mužů s nádorem varlete (*Zondek*)
- 70.léta 20.století -  $\alpha_1$ -**fetoprotein** objeven při pokusných transplantacích nádoru jater u myši (hepatom) (*Tatarinov*), krátce nato popsán i u lidských hepatomů (*Abelev, Masopust*)
- Následně intenzivní výzkum další onkofetálních antigenů a jejich praktické **využití v onkologii a prenatální diagnostice**

# Klinickobiochemické rozdělení nádorových markerů

- 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.*

$\alpha_1$ -fetoprotein (**AFP**),

lidský choriový gonadotropin (**hCG**),

karcinoembryonální antigen (**CEA**)



# Tkáňově a orgánově specifické antigeny

- látky, které se fyziologicky nacházejí ve zdravé tkáni či orgánu a mimo něj pronikají jen v minimálně. Za patologických stavů (nádorové onemocnění, zánět, trauma) dochází k jejich zvýšenému 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 squamosních buněk (**SCC**), thyreoglobulin (**TG**), hormony a jejich prekursorů u nádorů žláz, které je fyziologicky produkují (C-peptid u insulinomu, kyselina vanilmandlová u feochromocytomu)

# Nespecifické antigeny

- enzymy a hormony produkované nádory (u nádorů z orgánů, které je fyziologicky neprodukuje – *paraneoplastický projev*).  
feritin, thymidinkinasa (TK),  $\beta_2$ -mikroglobulin, některé reaktanty akutní fáze, hormony produkované nádory orgánů, které je fyziologicky neprodukuje, např. plicní nádory – ACTH, ADH, parathormon a další

# Chemická povaha nádorových markerů

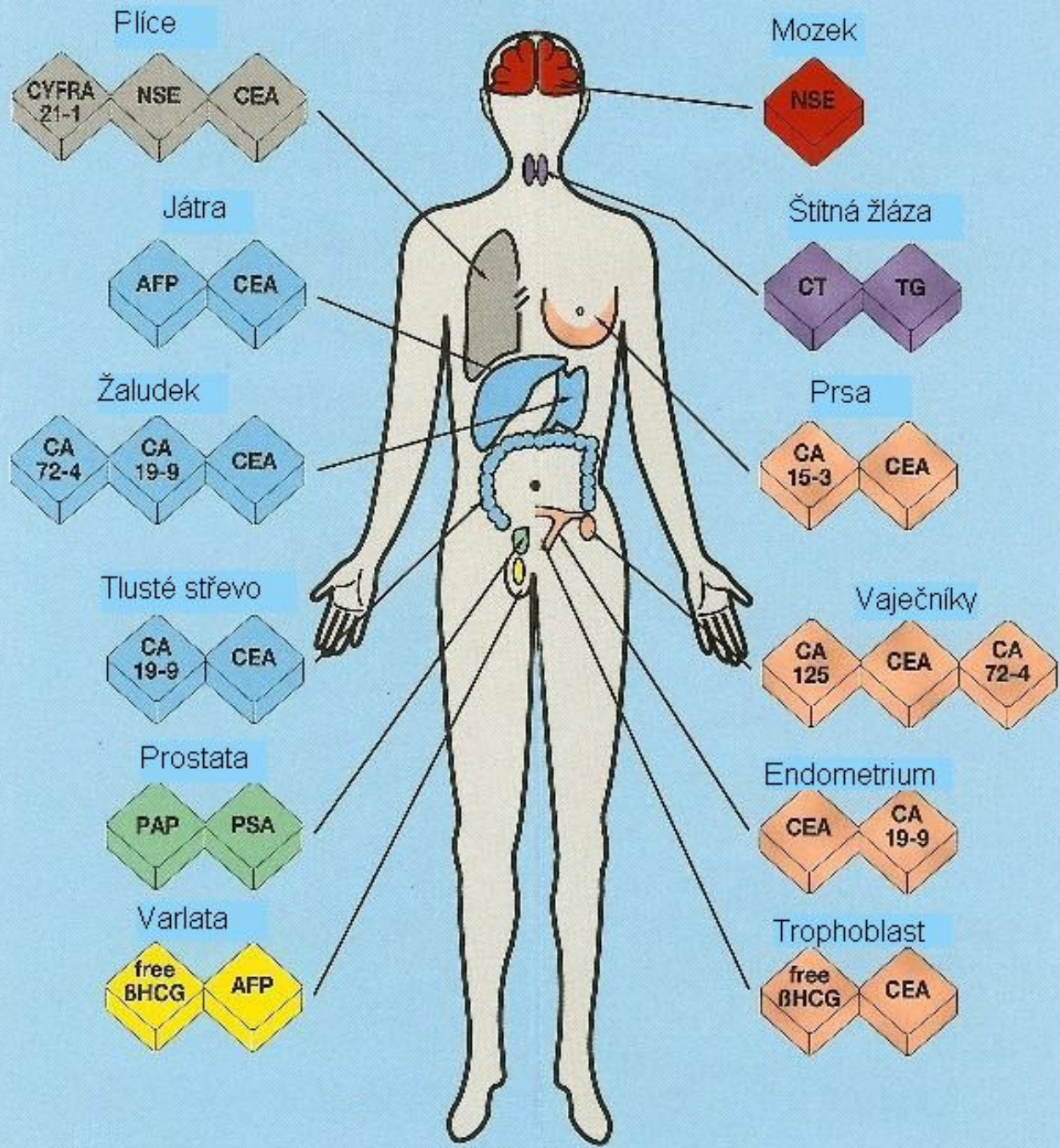
- **Enzymy** – prostatický specifický antigen (**PSA** – serinová proteasa), **NSE, TK, LDH**
- **Cytokeratiny** (rozpuštěné deriváty) – tkáňový polypeptidový antigen (TPA), fragment cytokeratinu 19 (CYFRA 21-1)
- **Hormony** (a příbuzné látky) – růstový hormon (GH), ACTH, Tg, prolaktin, kalcitonin, parathormon (PTH), gastrin, (hCG)
- **Imunoglobuliny** (a příbuzné látky) – IgG, IgM, IgA, IgD, IgE,  $\beta_2$ -mikroglobulin
- **Glykoproteiny, glykolipidy a sacharidy**  
AFP, hCG, SCC, CA 19-9 (glykolipid), CA 125 (glykoprotein), CA 50 (glykolipid), CA 15-3 (sialomucin), CA 72-4, CEA, Tg

# Ideální marker

- Vysoce specifický – nevyskytuje se u benigního onemocnění a zdravých osob
- Vysoce citlivý – začne se měřitelně zvyšovat v samém počátku onemocnění
- Orgánově specifický
- Koreluje s velikostí a stadiem nádoru
- Koreluje s prognózou
- Má spolehlivou předpovědní hodnotu

# Ideální marker

- Neexistuje
- Zatím



# Možnosti využití nádorových markerů

- Screening
- Potvrzení diagnózy
- Sledování choroby, prognóza
- Monitorování odpovědi na léčbu
- Sledování po léčbě, detekce návratu onemocnění



# Screening

- není možný přes celou populaci
- cílený na rizikové skupiny
- mamograf pro Ca prsu
- karcinom prostaty – PSA
- kolorektální karcinom – krev ve stolici



# Potvrzení diagnózy

- diferenciální diagnostika
- pouze pro karcinom varlat a choriokarcinom pro hCG a AFP
- je třeba brát v úvahu benigní onemocnění zvyšující TM

# Vhodné využití nádorových markerů

- Screening
- Potvrzení diagnózy
  
- Sledování choroby, prognóza
- Monitorování odpovědi na léčbu
- Sledování po léčbě, detekce návratu onemocnění

# 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**

# Výpovědní hodnota vyšetřovaného markeru závisí na jeho

## 1. Specificitě

- schopnost vyloučit chorobu při negativním výsledku
- vyšší snižuje falešnou pozitivitu

správně negativní

---

správně negativní + falešně pozitivní

# Dále závisí na jeho

## 2. Senzitivitě

- schopnost určit chorobu při pozitivním výsledku
- vyšší snižuje falešnou negativitu

$$\frac{\text{správně pozitivní}}{\text{správně pozitivní} + \text{falešně negativní}}$$

**např. pro karcinom tlustého střeva má CEA**

95% specificitu – označí nesprávně 5%  
vyšetřovaných jako nemocné

70% senzitivitu – nezachytí tedy 30%  
nemocných

# Nové možnosti vyšetřovacích metod

- **Dříve**
  - náročná vyšetření dostupná jen na specializovaných pracovištích.
- **Dnes**
  - imunochemická stanovení s výsledkem do několika hodin
- ! **Problém**
  - cena je nižší, ale mnohonásobná oproti rutinní biochemii
  - výpovědní hodnota vyšetření je neadekvátní



# Imunochemická stanovení

- Radioimunoanalýza (RIA, IRMA)
- Enzymoimunoanalýza (ELISA, EIA, MEIA)
- Fluorescenční (FIA) nebo
- Chemiluminiscenční (CLIA) imunoanalýza





# ADVIA:CENTAUR Siemens

Chemiluminescence

- CEA
- hCG
- AFP
- CA 15-3
- CA 125
- CA 19-9
- Ferritin
- HER2/neu



# Doporučení EGTM

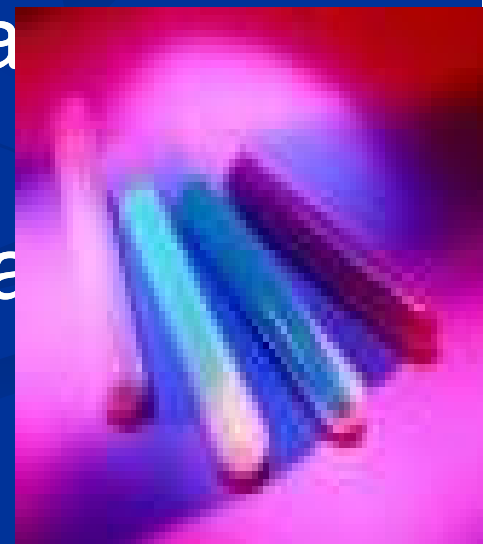
(Evropské skupiny pro nádorové markery)

- Požadavky na kvalitu a kontrolu
- Nádory onkofetální
- Nádor prostaty
- Nádor prsu
- Gynekologické nádory
- Gastrointestinální nádory
- Plicní nádory



# Preanalytická část

- informovat lékaře o požadavcích na odběr je povinnost laboratoře
- nádorové markery mají zanedbatelnou diurnální variabilitu
- dříve nepoužitá odběrová zkumavka
  - detergenty, chlornany - ruší stanovení
- skladovat při 2-8°C do 48 h, pak mrazit

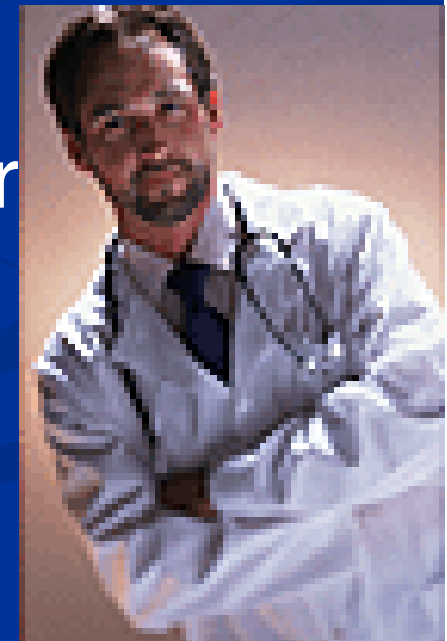


# Preanalytická část

- Vliv odběru a manipulace se vzorkem
  - citlivost na hemolýzu - NSE, do 60 min po odběru stáhnout sérum
  - PSA - do 3 hodin stáhnout sérum
  - sliny, pot- SCC, CA 19-9, CEA, TPS
- Vliv použité metodiky
  - léčba monoklonálními protilátkami může ovlivnit imunochemické stanovení užívající podobné protilátky
  - při vysoké koncentraci „hook effect“ – řešení - metody používající několikakrokovou analýzu

# Onkofetální nádory

- U mužů nejčastější maligní onemocnění ve věku 15-35 let
- AFP, hCG, LDH
- hladina markerů má vliv na volbu terapie
- screening - žádný vhodný marker
- 90% léčitelnost
- monitorování léčby
  - 1.rok - každý měsíc
  - 2-3 rok - každý 2 měsíce



# AFP

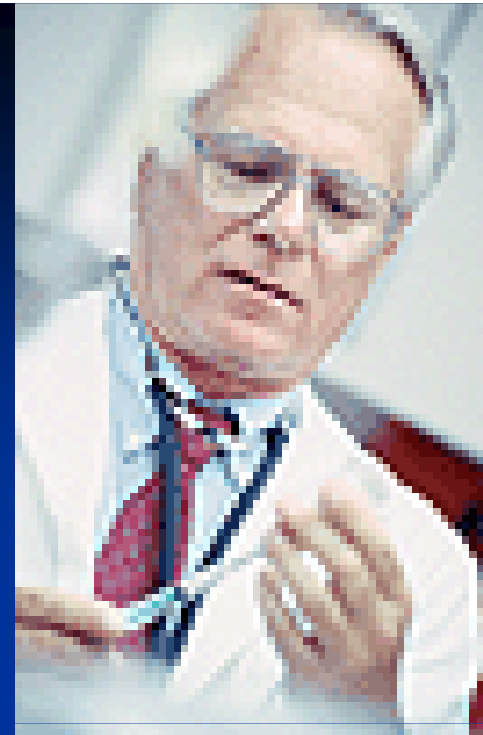
- glykoprotein podobný albuminu
- diagnostika a monitoring primárního hepatocelulárního karcinomu a germinálních nádorů
- prognostika germinálních nádorů
- ref.meze do **10 μg/l**
- biolog.poločas - **5 dní**
- falešná pozitivita - hepatitida, cirhóza, nekróza jater, gravidita

# hCG

- glykoprotein, podjednotky  $\alpha$  a  $\beta$
- diagnostika a monitoring onkofetálních nádorů
- 97% senzitivita
- ref.meze do **10 IU/l**
- biologický poločas - **1-2 dny**
- falešná pozitivita - myomy, ovariální cysty

# Nádory prostaty

- častá příčina smrti u mužů
- včasná detekce
- PSA, FPSA
- screening nemá dostatečnou výtěžnost (30%) -  
specificitu PSA lze zvýšit měřením objemu prostaty nebo  
seriovým měřením PSA - „doubling“ time
- až 80 typů stanovení PSA- monitorování stejnou metodou
- asi 25% karcinomů nemá zvýšené PSA - další diagnostika





# PSA

- glykoprotein, serinová proteáza
- diagnostika a monitoring karcinomu prostaty
- screening u symptomatické populace
- odběr krve před jakoukoliv manipulací s prostatou
- ref.meze do 4  $\mu\text{g/l}$
- biologický poločas - **2 - 5 dní**
- FPSA - odlišení benigní hyperplazie, jinak nevhodný pro sledování terapie

# Nádor prsu

- u žen v prům. zemích jedna z nejčastějších příčin smrti
- CEA, CA 15-3 + cytokeratiny (TPA, TPS, CYFRA 21-1)
  - 12.2% riziko
  - nepoužitelné pro včasnou diagnostiku nádoru
  - vysoká hladina markeru - vzdálené metastázy (60-80%)
  - monitorování léčby



# CEA

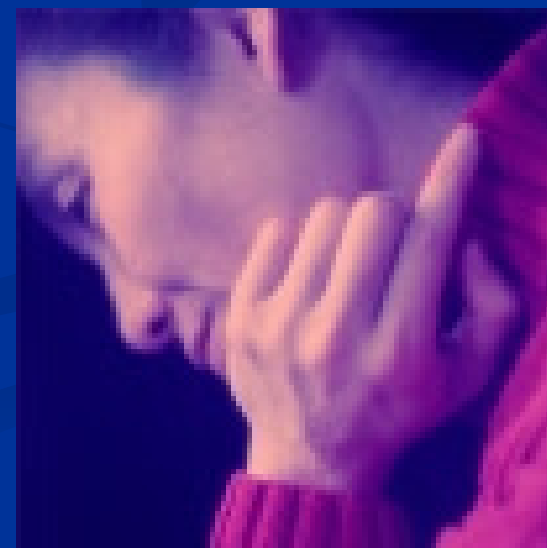
- karcinoembryonální antigen - glykoprotein
- diagnostika nádoru prsu, plic, dobře diferencovaných kolorektálních nádorů
- monitorování kolorektálních nádorů
- ref.meze do **10  $\mu\text{g/l}$** , u kuřáků vyšší hladiny
- biologický poločas - **1-2 dny**
- falešná pozitivita - záněty GIT, hepatitida, cirhóza, pankreatitida

# CA 15-3

- mucin identifikovaný monoklonálními protilátkami
- diagnostika a monitorování nádoru
- 70% žen s vyšší hladinou má metastázy
- při progresi 75% citlivost při 90% specifitě
- ref.meze do **31 kIU/l**
- biologický poločas - není znám
- falešná pozitivita - poměrně častá, do 50 kIU/l, onemocnění vaječníků, plic, prsů, hepatitida, cirhóza

# Gynekologické nádory

- u žen 15% všech nádorů - nejčastější jsou nádory endometria, pak vaječníků a čípku děložního
- **CA 125, SCC, hCG, AFP**
- chybí časné symptomy - až 70% pokročilá stadia nádorů
- CA 125 - nádor endometria - adenokarcinomy
- hCG – choriokarcinom
- SCC - nádor čípku
- pouze monitorování léčby



# CA 125

- nemucinózní glykoprotein identifikovaný monoklonální protilátkou
- monitorování nádorů vaječníků, endometria
- screening jen u vybrané populace - nízká citlivost i specifita markeru
- prognóza po terapii - vyšší hladina po operaci vždy znamená návrat, nízká neznámá, že k návratu nedošlo
- ref.meze do **35 kIU/l**
- biologický poločas - **2- 6 dní**
- falešná pozitivita - **menstruace**, hepatopatie, onemocnění ovárií, endometria, pankreatitida, gravidita

# SCC

- glykoprotein - serin proteinázový inhibitor
- diagnostika nádoru čípku děložního, pomoc při histologické diagnóze u nádorů plic dále u nádorů hlavy, krku, jícnu a vaginy zvýšený
- monitorování léčby, nevhodný pro diagnostiku
- ref.meze do **2 µg/l**
  - SCC > 2 µg/l -95% pravděpodobnost NSCLC a 80% pravděpodobnost, že jde o squamózní nádor
- biolog.poločas - **20 minut** - pro hodnocení efektu terapie
- falešná pozitivita - psoriáza, nemoci plic, jater a ledvin, ovariální cysty, mastopatie, gravidita, dialýza

# Gastrointestinální nádory

- v ČR u žen i mužů na 2.místě v úmrtnosti na nádory
  - 2x častější než v USA - dědičné faktory
- Kolorektální nádory - CEA
- Slinivka břišní - CA 19-9
- Žaludek - CA 72-4, CEA, CA 19-9
- Jícen - SCC, CYFRA 21-1, TPS, TPA, u adenokarc.
- Hepatocelulární nádory - AFP rozšířené v Číně a části Afriky
- **Screening** - nevhodný u asymptomatické populace - nízká senzitivita i specifita markerů





# CA 19-9

- glykoproteinový antigen mucinózního typu, příbuzný antigenu krevní skupiny Lewis H -5% populace jej neprodukuje
- diagnostika a monitorování nádoru pankreatu
- cholestáza zvyšuje hladinu
- ref.meze do **37 kIU/l**
- biologický poločas - asi 7 h
- falešná pozitivita - akutní hepatitida, pankreatitida, biliární choroby, revmatické choroby

# CA 72-4

- Glykoprotein identifikovaný monoklonální protilátkou
- vysoká specificita (až 100%), citlivost vyšší než CEA a CA 19-9
- monitorování nádoru žaludku
- vhodný při sledování terapie u pacientů s krevní skupinou Le a-/b- místo CA 19-9
- ref.meze do **4 kIU/l**
- biologický poločas - není znám
- falešná pozitivita - nepříliš častá, onemocnění žaludku

# Nádory plic

- u mužů i u žen v industrializovaných zemích jedna z nejčastějších příčin smrti
- chemicky vyvolané karcinomy
- CYFRA 21-1, CEA, NSE, CA 125, TPA
- rozdělení podle histologických typů
  - nádory squamózních buněk
  - adenokarcinomy
  - velkobuněčné nádory
  - malobuněčné nádory (SCLC)
    - - 20-25% liší se klinicky i biologicky ostatních typů



# CYFRA 21-1

- stanovuje fragmenty cytokeratinu 19
- monitorování NSCLC a nádoru močového měchýře
- vysoká senzitivita pro NSCLC
- ref.meze do 3,3 µg/l
- biologický poločas - několik hodin
- falešná pozitivita - chronické renální selhání, cirhóza, astma, tuberkulóza, akutní infekce.

# NSE

- glykolytický neurospecifický izoenzym enolázy
- diagnostika a monitorování SCLC, neuroblastomů, apudomů
- u nádorů CNS se stanovuje v likvoru
- ref. meze do **14,7**  $\mu\text{g/l}$
- biologický poločas - **1 den**
- separovat sérum do 60 minut po odběru!
- falešná pozitivita - dlouhé stání krve po odběru, jaterní a plicní onemocnění

# Markery posledních 5 let

- Chromogranin A
  - marker první volby u neuroendokrinních tumorů, i pro karcinom prostaty v případě jeho neuroendokrinní diferenciance.
- Nádorový izoenzym pyruvátkinázy
  - Pro histologicky homogenní seminomy nebo karcinomy ledvin
- Interleukin-6 (IL-6)
  - senzitivní marker hepatocelulárního karcinomu,
  - nemocní s extrahepatálními metastázami mají až 50x zvýšené hladiny

# Další používané markery

- **TPA** -tkáňový polypeptid. antigen, cytokeratiny 8, 18, 19
- **TPS** - cytokeratin 18
- **TK** - tymidinkináza - ukazatel buněčné proliferace
- **β2-microglobulin** - nízká hmotnost, prochází do moče, chronická lymfatická leukémie, mnohočetný myelom
- **Ferritin** - akutní myeloblastická leukémie, Hodgkinova choroba, mnohočetný myelom

# Méně časté markery

- **S100B** - protein fyziologicky se vyskytující v nervové tkáni, slouží k monitorování pacientů s maligním melanomem.
- **CA 549** - mucin - nádory prsu
- **MCA** (mucin-like cancer associated antigen) metastazující nádory prsu



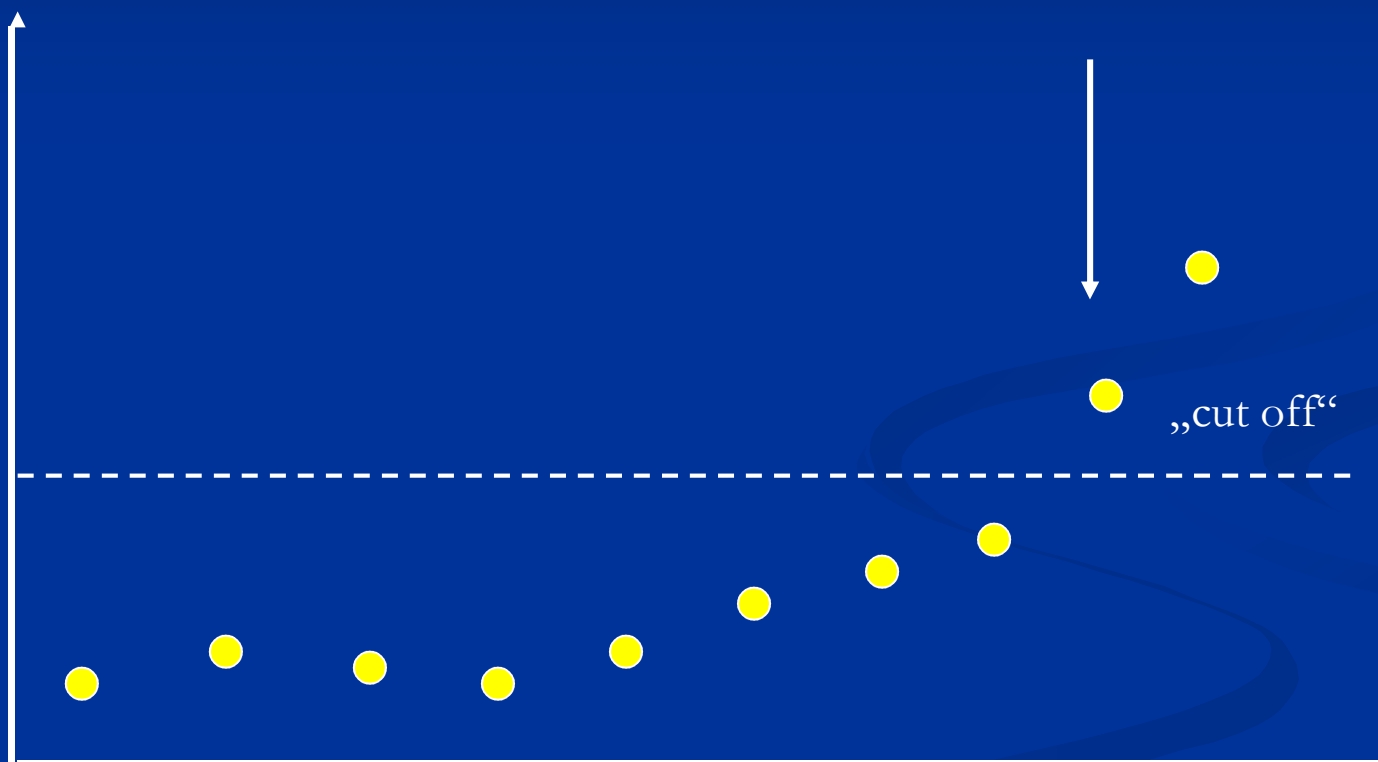
# Práce se získanými údaji



- sledovat trend růstu hladin nádorového markeru i v rámci referenčních mezí
- možnost kumulativních nálezů
- využití dostupných expertních programů

# Dynamické sledování

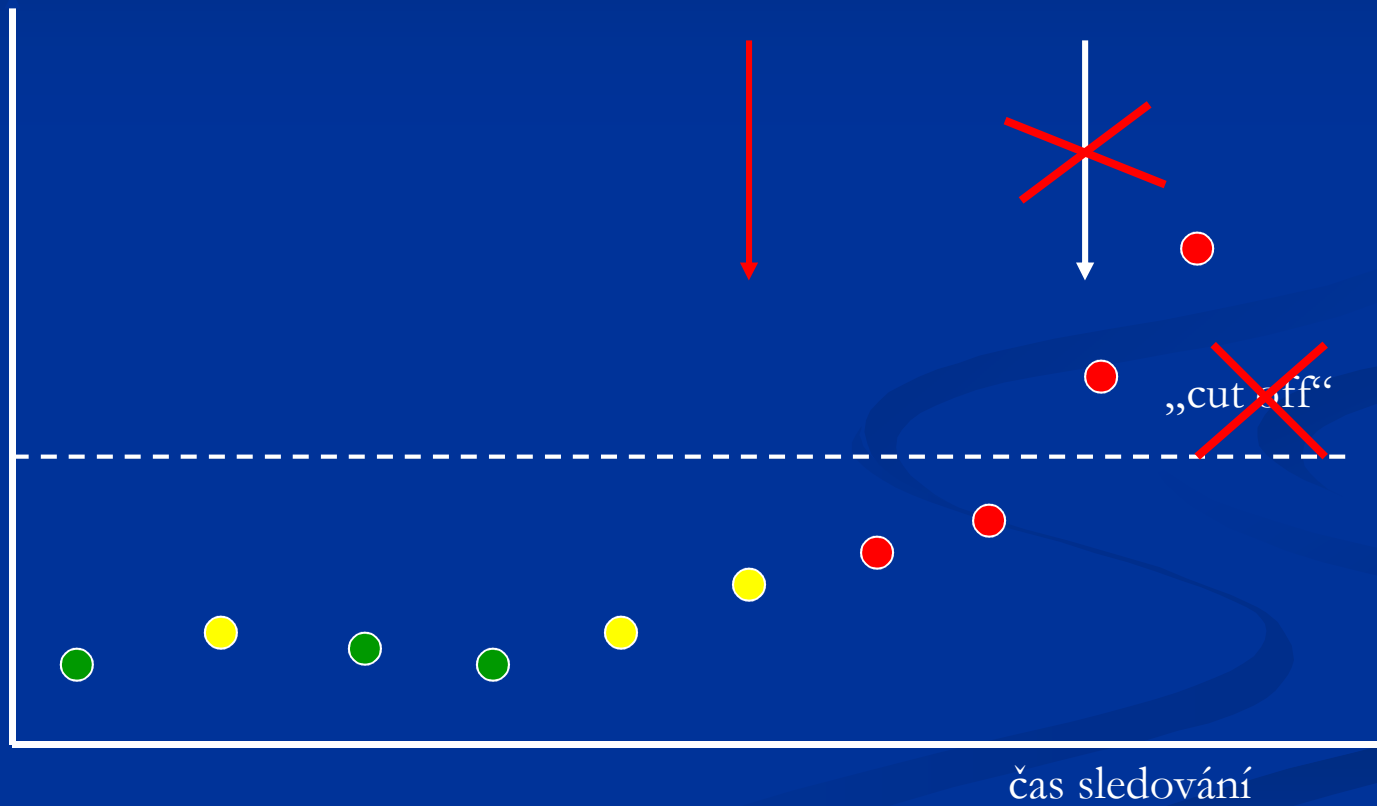
koncentrace  
TM v krvi



čas sledování

# Dynamické sledování

koncentrace  
TM v krvi



# Molekulárně biologické techniky

- imunochemické metody stanovení klasických nádorových markerů budou brzy nahrazeny metodikami s vyšší analytickou senzitivitou a schopností vyšetřovat sledované analyty na úrovni genu (DNA, mRNA )
- Nové techniky umožní posun záchytu onemocnění na diagnostickou (až screeningovou) úroveň
- Význam při záchytu onemocnění po primárním terapeutickém zásahu
  - v cirkulaci nebo spádových lymfatických uzlinách lze nalézt jednotlivé nádorové buňky. Nasazení podpůrné terapie před detekcí zobrazovacími technikami
- Poznání klíčových principů biologie
- Umožní vyvíjet specifické protinádorové terapie

# 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), EGFR, IGF, TNF- $\alpha$**

# Potenciální nové tumor markery

- **Adheze** - ICAM-1, VCAM-1
- **Angiogeneze** – inhibitory angiogeneze - angiostatin, angiogenin, trombospondin
- **Markery spojené se specifickými vlastnostmi nádorových buněk** – matrix metalloproteinasy
- **Další markery**
  - **Mimobuněčná volně cirkulující DNA** – nekróza tumorových buněk

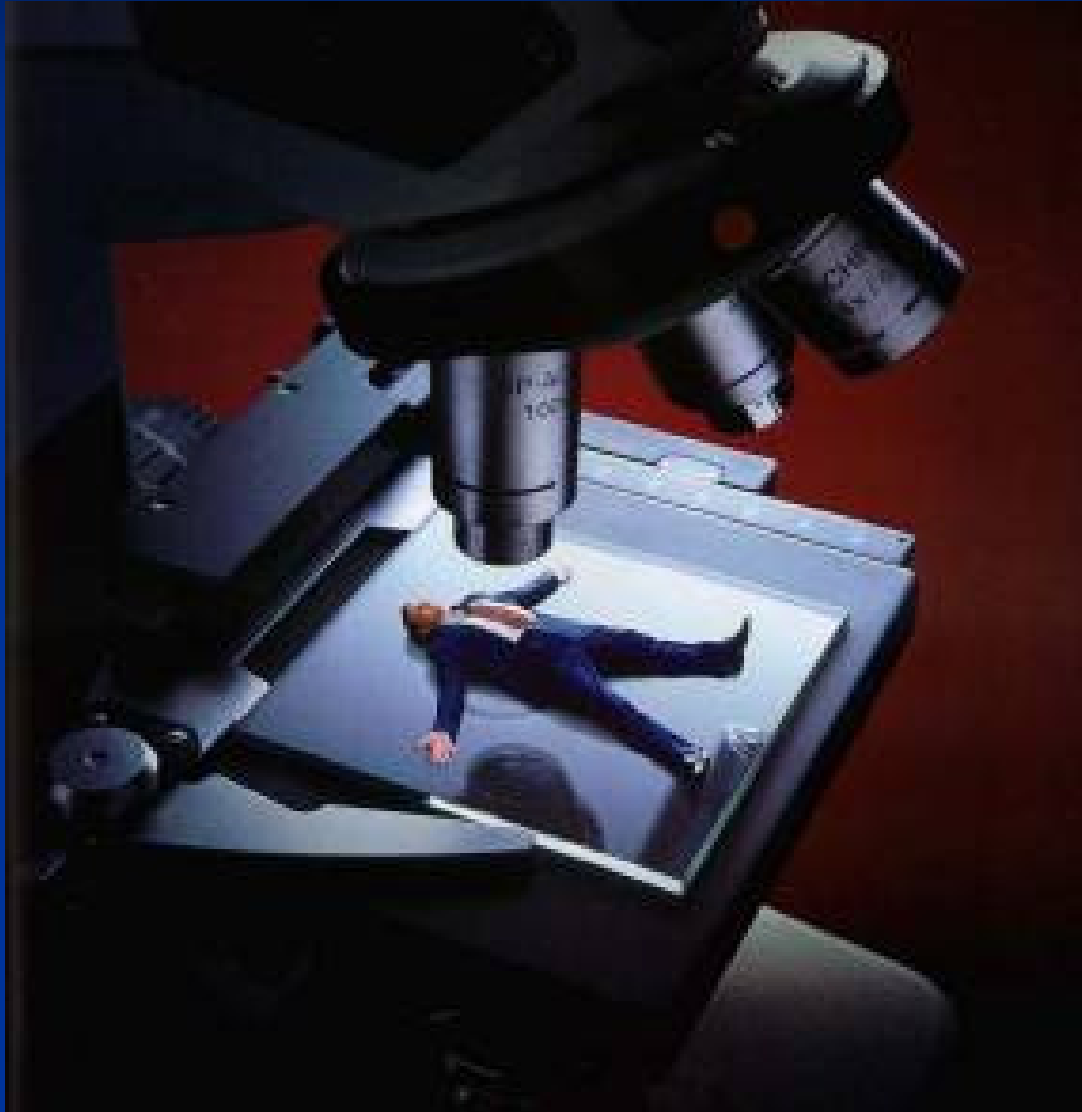
# Závěry

- Nízká hladina TM neznamená, že nádorové onemocnění není přítomno
- Vysoká hladina TM neznamená, že nádorové bujení je přítomno.
- Nádorové markery by se měly stanovovat jednou metodou v jediné laboratoři
- Neexistují mezinárodní standardy, význam EQA

# Závěry

- Klasické sérové nádorové markery jsou v současnosti stále významným spolurozhodovacím nástrojem pro monitorování onkologických nemocných a sledování účinku terapie.
- Přestože jsou některé molekulárně-biologické techniky již nyní vhodné pro rutinní stanovení (obzvláště v oblasti molekulární genetiky jsou již poměrně rozšířené), jejich zavedení do běžné onkologické praxe bude vyžadovat ještě určitý čas.





**Nejsou zdraví  
lidé, jsou jen  
nedostatečně  
vyšetření**

# Ras protein a p53 protein

