

Nádorové (tumorové) markery

Petr Breinek

BC_TM_N2011

Definice

- Široké spektrum molekul (většinou proteinů) rozdílných vlastností, které se vyskytují se ve zvýšené koncentraci v nádorových tkáních nebo v krvi onkologických nemocných
- Mohou být produkovány nádorovými buňkami (s nádorem asociované antigeny) nebo jinými tkáněmi jako jejich odpověď na maligní proces (indukované TM)

Jaký je význam stanovení TM?

- Sledování efektu terapie/průběhu choroby
- Návrat choroby (remise)
- Upřesnění diagnózy
- Určení prognózy
- Podezření na reziduální nádor

Negativní nález neznamená nepřítomnost nádoru

Universální tumorový marker, který by jednoznačně určil, zda jedinec má nebo nemá nádorovou chorobu **není zatím znám**

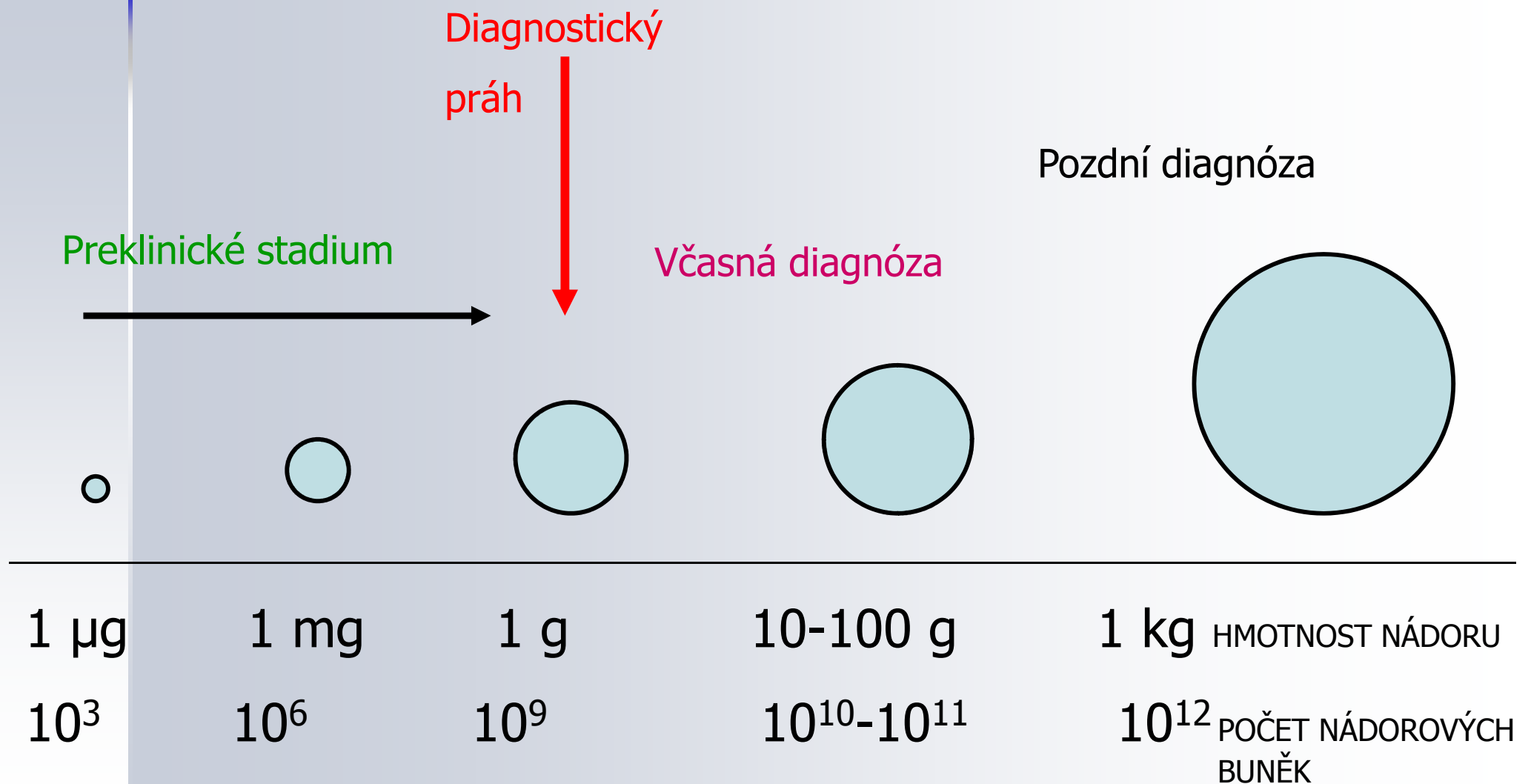
Nádorová onemocnění (rakovina)

- Druhá nejčastější příčina úmrtí
- V průběhu života onemocní v ČR rakovinou každý třetí a každý čtvrtý na ni zemře
- Vyléčí se asi 47% nemocných (63% Island a Švédsko)
- Léčba v komplexních onkologických centrech

Nádorové buňky

- Nekontrovatelný růst určité části buněčné populace
- Změny v genomu/ enzymovém systému
- Jsou narušeny kontrolující a řídicí mechanismy pro normální růst

Vývoj maligního nádoru a jeho zachycení



Rozdělení nádorů

- Benigní (nezhoubné)
- Maligní (zhoubné)
 - karcinomy (epiteliální nádory)
 - sarkomy (mesenchymální původ)
 - hematologické nádory
 - metastázy
(druhotné ložisko maligního nádoru)

Třídění tumorových markerů (podle výskytu)

1. **Humorální** (prokazované v krvi nebo jiných tělesných tekutinách)
2. **Celulární** (buněčné, vyskytují se v nádorových buňkách nebo na jejich povrchu)

Třídění tumorových markerů (podle biologické funkce)

1. Onkofetální a onkoplacentární antigeny (CEA, AFP, hCG)

Onkofetální antigeny – látky vytvářené organismem ve fetálním období (po narození se tvoří jen v souvislosti s nějakým onemocněním, nejčastěji nádorem)

2. Karbohydrátové molekuly s epitopy rozpoznávané pomocí mAb

(CA = carbohydrate antigen, CA125, CA 15-3, CA 19-9, CA 72-4)

3. Proliferační a diferenciační antigeny

(TPS, PSA)

4. Hormony (hCG, ACTH, parathormon, kalcitonin)

5. Enzymy (NSE, TK, LD)

6. Specifické proteiny (ferritin, monoklonální imunoglobuliny/ paraproteiny)

7. Receptory (estrogenové, progesteronové)
8. Metabolity (metanefriny, katecholaminy)
9. Onkogeny a onkoproteiny (p53, BRCA1)



Gen buněčného nebo virového původu
zodpovědný za rychlý a nekontrolovaný růst
živočišných buněk (mutovaný gen)

Vznikne z **protoonkogenu**, který po aktivaci je
schopen vyvolat neoplastickou transformaci

Metody stanovení TM

1. Imunoanalytické metody
2. Stanovení enzymů
3. Metody chromatografické
4. Metody molekulární biologie

Doporučená přesnost stanovení

- Opakovatelnost (přesnost v sérii): <5%
- Mezilehlá přesnost: <10%

Další metody používané pro diagnostiku nádorů

- Patologie
 - Histologie
 - Cytologie
 - Imunohistochemie
- Průtoková cytometrie
- Biofyzikální (rtg, CT, Sono, PET)
- Metody molekulární biologie
 - PCR, DNA mikroarray, proteomika

1.Imunoanalytické metody

Principem je vazba mezi antigenem (TM) a k němu specifickou protilátkou (Ab) získanou imunizací nebo synteticky, případně rekombinantně (monoklonální protilátky, mAb)

Nejčastěji používané principy IA

a) Fluorescenční metody

(FIA, FPIA, DELFIA, TRACE, ..)

b) Enzymová imunoanalýza, EIA

(EMIT, ELISA, MEIA, CEDIA, ..)

c) Luminiscenční imunoanalýza

(LIA, ILMA, CMIA, ECLIA,..)

Standardizace imunoanalytických metod na stanovení TM je nízká

Příčiny:

- ✓ Nízká specifita používaných protilátek, které jsou orientované proti nestejným epitopům
- ✓ Antigen existuje ve více izoformách
- ✓ Interference

Frekvence vyšetření TM

- Před nasazením terapie
- Po skončení terapie
- 1 měsíc v prvním roce po primární terapii
- 2 měsíce ve druhém roce
- 3 měsíce v dalších letech sledování
- při změně terapie
- Při nejasném průběhu nemoci

Biologický poločas (TM) v séru

Marker	Poločas	Marker	Poločas
CEA	14d	CA 125	4d
TPA	7d	PSA	2d
CA 15-3	7d	TK	2d
AFP	5d	hCG	1d
CA 19-9	5d	SCC	0,3h

Vyjadřování výsledků

- Koncentrace TM v krvi jsou velmi nízké
- Většina TM vykazuje heterogenitu
- Neexistuje certifikovaný referenční materiál

Jednotky koncentrace:

Látkového množství (ug/l a ng/l)

Biologická nebo imunologická aktivita (U/l, kU/l)

Referenční rozmezí ?

Cut-off (rozhodovací limit)

Je to koncentrační hladina markeru, pod kterou leží většina hodnot zdravých lidí.

Klinická specifita

Udává procento správně negativních výsledků ze souboru zdravých.

Čím vyšší specifita, tím je méně falešně pozitivních výsledků.

$$\textit{Specifita}(\%) = \frac{\text{počet správně negativních výsledků}}{\text{celkový počet zdravých}} \times 100$$

Doporučení: >95%

Klinická sensitivita (citlivost)

Udává procento správně pozitivních výsledků ze souboru nemocných.

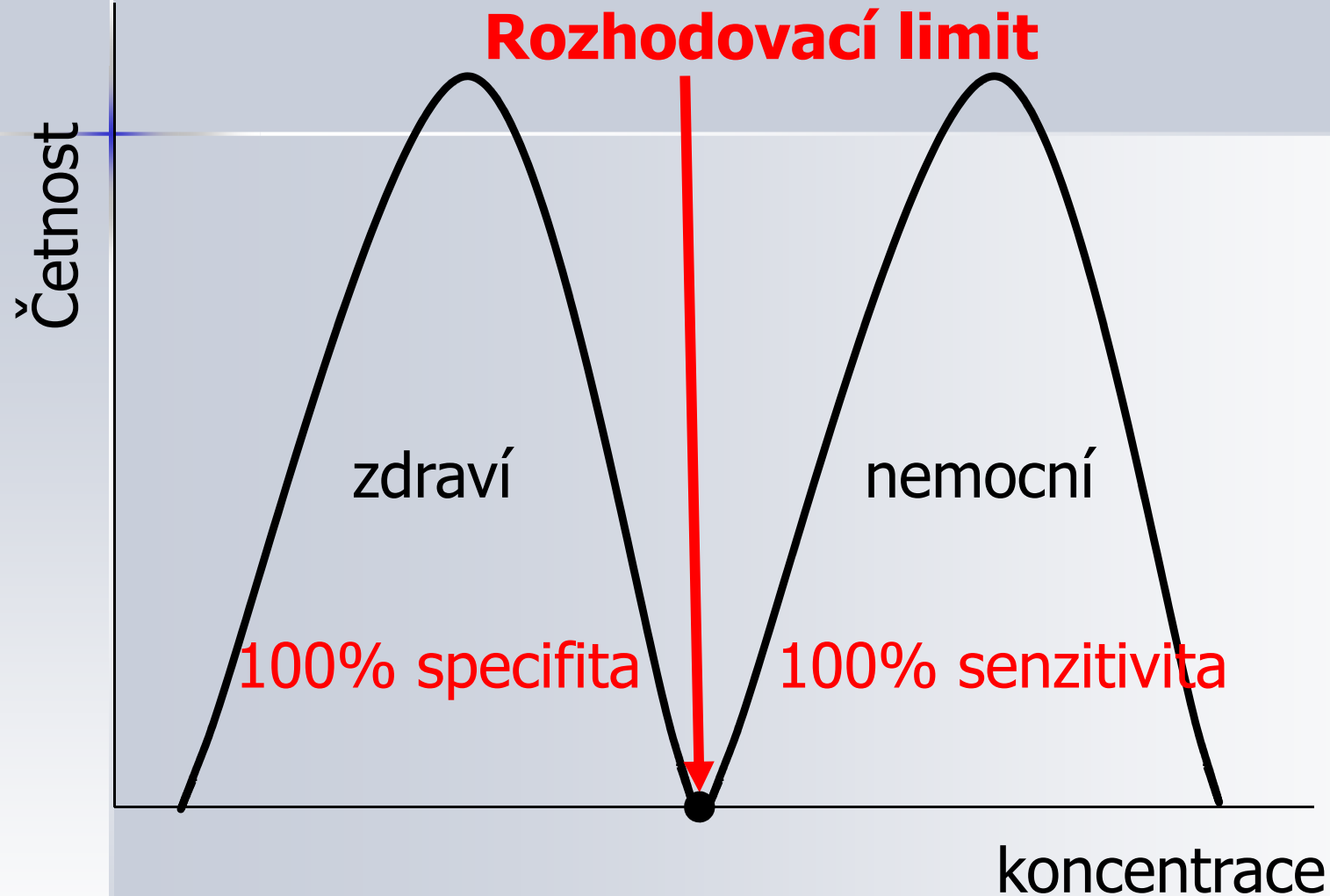
Čím vyšší sensitivita, tím je méně falešně negativních výsledků.

$$\textit{Sensitivita}(\%) = \frac{\text{počet správně pozitivních výsledků}}{\text{celkový počet nemocných}} \times 100$$

Doporučení: >50%

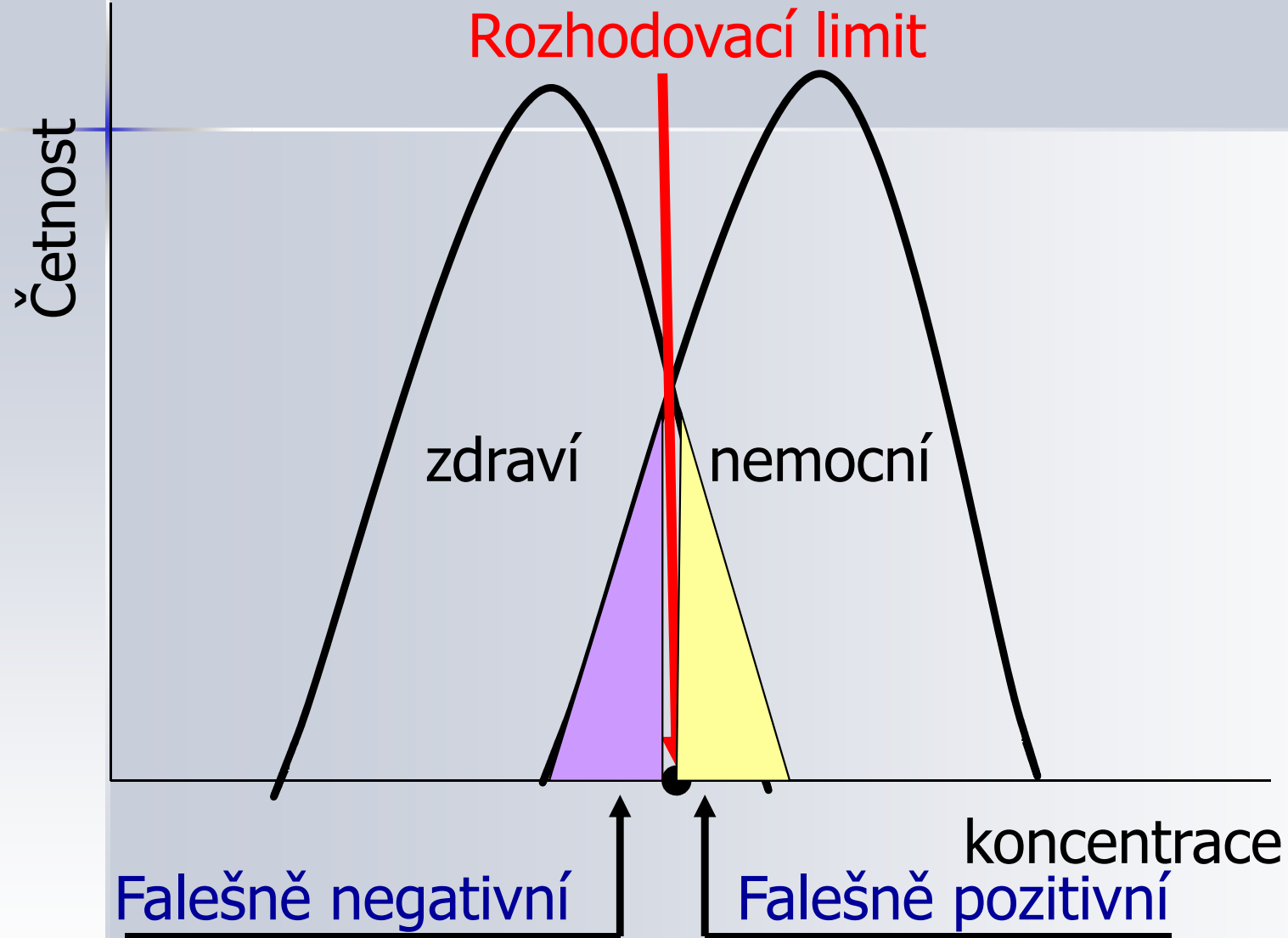
- Specificita = je obrazem správné negativity
- Senzitivita - odráží správnou pozitivitu

Klinické hodnocení nádorových markerů



Ideální stav

Klinické hodnocení nádorových markerů



Hodnocení TU markerů pomocí ROC křivek

(ROC = receiver operating characteristic)

senzitivita (%)

100 %

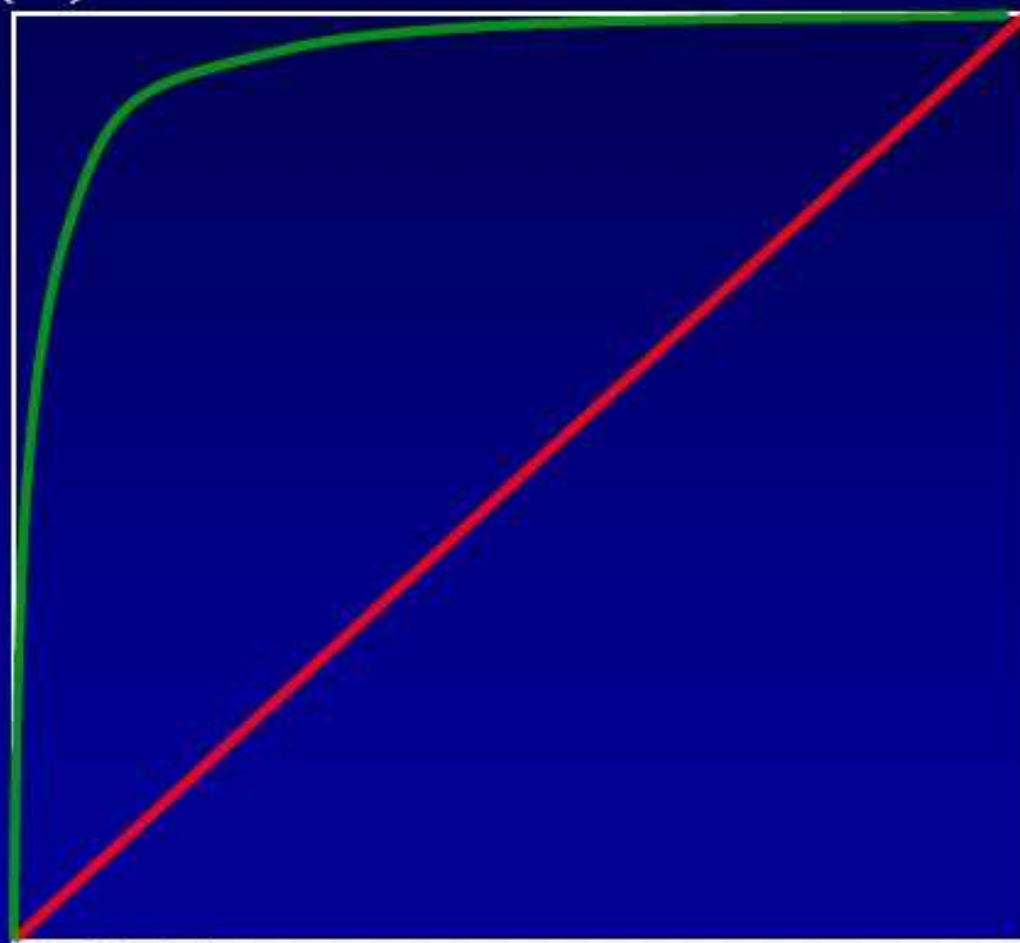
0 %

100 %

0 %

specifická (%)

- vhodný TU marker
- žádná diskriminace mezi zdravými a nemocnými



Významné změny hladin nádorových markerů

➤ Bez terapie

výrazný nárůst koncentrace ve třech následujících odběrech

➤ Během terapie

nárůst o $>25\%$ progrese onemocnění

pokles o $>50\%$ částečná remise

➤ Matematicko-statistické postupy

Diagnostické využití

Typ nádoru	Hlavní	Vedlejší
Tlusté střevo, rektum	CEA, CA19-9	
Žaludek	CEA, CA72-4	CA19-9
Pankreas	CA19-9, CEA	CA125
Prs	CA15-3, CEA	CA125, TPS
Ovarium	CA125, CA19-9	CA72-4
Děloha	SCCA, CA125	CEA

Diagnostické využití

Typ nádoru	Hlavní	Vedlejší
Plíce (malobuněčný)	NSE, CEA	TPS
Plíce (nemalobuněčný)	CYFRA 21-1	SCC
Germinální nádory	hCG, AFP	NSE
Játra	AFP, CA19-9	CEA
Močový měchýř	TPA, TPS	CYFRA 21-1
Prostata	PSA, FPSA	
Hematoonkologické	TK, B ₂ M	paraprotein

Zvýšené hodnoty můžeme nalézt také:

- U nemaligních onemocnění(hyperplázie prostaty-PSA)
- Po vyšetřovacích zásazích(rektální vyšetření prostaty-PSA)
- Po chirurgickém zákroku(CA 19-9, CA 125)
- Po kontaminaci analyzovaného materiálu(sliny-SCCA)
- Při akutní terapii(chemoterapie, radioterapie-TPS)
- Interference (hemolýza-NSE)
- Kouření (CEA), těhotenství (hCG)
- Onemocnění ledvin a jater

Možnost zvýšení hodnot TM u benigních onemocnění

TM	Nemaligní onemocnění	Jiná příčina
CEA	Zánětlivé choroby jater, jaterní cirhóza, pankreatitida	Kouření
AFP	Zánětlivé procesy plic, GIT, jaterní cirhóza, akutní a chronická hepatitida	
TPA	Infekční procesy, jaterní cirhóza, pankreatitida	
CA15-3	Jaterní cirhóza, akutní hepatitida, postižení ledvinných glomerulů	
CA125	Ovariální cysty, choroby jater, pankreatu, žlučníku	Těhotenství (1.trimestr)
CA19-9	Jaterní cirhóza, cholelithiáza, chronická hepatitida, akutní a chronická pankreatitida, choroby žlučových cest, diabetes	
hCG	Mola hydatidóza	Těhotenství
B2M	Postižení ledvin	
Ferritin	Záněty obecně, poruchy metabolismu železa	
CYFRA21-1	Choroby urologického traktu, myomy/ovariální cysty	

Enzymy

- LD (laktátdehydrogenáza)
- NSE (nespecifická enoláza)
- PSA (prostatický specifický antigen)
- TK (thymidinkináza)
- ACPP (prostatická kyselá fosfatáza)
- Tumor M2-PK (izoenzym pyruvátkinázy)

PSA

(prostatický specifický antigen)

- Fyziologicky syntetizován v epitelu prostaty u zdravých osob, ve zvýšené míře u nemocných s hyperplázií a s ca prostaty.
- Glykoprotein (10% sacharidů), působí jako **serinová proteáza**
- Vyskytuje se ve **volné formě (FPSA)** a ve formě **komplexů (PSA-AMG a PSA-ACT)**

AMG=alfa2-makroglobulin

ACT=alfa1-antichymotrypsin

PSA

(prostata specifický antigen)

➤ *Zvýšené hodnoty:*

Benigní hyperplázie prostaty (BHP) a maligní hypertrofie prostaty (ca prostaty)

➤ *Nespecifické zvýšení:*

záněty prostaty (prostatitidy), mechanické dráždění prostaty (vyšetření „per rectum“, jízda na kole)



Volný PSA (FPSA)

- Zvýšená specifita vyšetření
- Poměr FPSA/PSA
pro „šedou zónu“ PSA 4-10 µg/l
- 0-15% malignita
- 15-25% malignita i benigní hyperplazie
- nad 25% benigní hyperplazie

Onkofetální antigeny

➤ AFP

➤ CEA

AFP (alfa fetoprotein)

- Syntetizován již během vývoje plodu, mizí po porodu. Hlavním zdrojem jsou fetální játra.
- Glykoprotein (4% sacharidů) podobný albuminu, popsán 1963
- Různé molekulové varianty lišící se v glykosylaci
- Prof.MUDr. J. Masopust Dr.Sc.

AFP (alfa fetoprotein)

- Součást screeningu vrozených vývojových vad (v 2. trimestru)
- *Zvýšené hodnoty:*
 - ca hepatocelulární, testes, ovaria, žaludek, pankreas
- *Nespecifické zvýšení:*
 - hepatitidy, fyziologicky v graviditě, fetální abnormality, alkoholismus, cirhóza a selhání jater

CEA

(Karcinoembryonální antigen)

- Fyziologicky je syntetizován již během vývoje plodu. Hlavním zdrojem je povrch sliznic převážně v gastrointestinálním traktu a v pankreatu.
- Glykoprotein (50% sacharidů, 641 AK)
- Různé molekulové varianty lišící se v glykosylaci, existuje >36 variant, ovlivňuje buněčnou adhezi

CEA

➤ *Zvýšené hodnoty:*

- **kolorektální ca**, ca žaludku, ca pankreatu, ca plic, prsa, játra

➤ *Nespecifické zvýšení:*

jaterní cirhóza, pankreatitida, **kuřáci**, alkoholismus, zánětlivé střevní, plicní a žaludeční onemocnění, hepatitidy, autoimunní choroby

Fragmenty komplexních glykoproteinů, jejichž epitopy jsou rozpoznávané monoklonálními protilátkami

- CA19-9 (také GI-CA, GI-MA)
- CA15-3
- CA125
- CA72-4

Fragmenty cytokeratinů

- TPS
- TPA
- CYFRA21-1

Monoklonální imunoglobuliny

➤ Paraproteiny

abnormální imunoglobuliny produkovány proliferujícím klonem plazmatických buněk, případně B-lymfocytů

➤ Volné lehké řetězce

(Bence-Jonesova bílkovina v moči)

Hormony a jejich metabolity

- **hCG**
- **PTH**
- **ACTH**
- **Kalcitonin**
- **Gastrin**
- **Prolaktin**
- **Norepinefrin**
- **epinefrin**

Tkáňové markery

Molekuly receptorové povahy

➤ Estrogenový receptor

➤ Progesteronový receptor

(Steroidní receptory, markery ca prsu, pozitivita je indikací k terapii antiestrogeny)

➤ Receptor pro IL-2

➤ C-erb-B2, ...

Záměry onkologického programu

- Snížit výskyt a úmrtnost na nádorové onemocnění
- Zlepšit kvalitu života onkologicky nemocných
- Racionalizovat náklady na diagnostiku a léčbu rakoviny



Závěr

Nádorové markery nelze přeceňovat,
ale ani zatracovat.

Budoucnost

- Mikročipové technologie
- Genomová a proteomová analýza
- Vysokorozlišovací dvojrozměrná elektroforéza
- Hmotová spektrometrie