

Nádorové (tumorové) markery

Petr Breinek



BC_TM_N2012

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)

Negativní nález neznamená nepřítomnost nádoru

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

Jaký je význam stanovení TM?

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

Nádorové buňky

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

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

Onkogen

- **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

Nádorové markery v éře molekulární medicíny

Nové molekulárně biologické techniky
vyšetřující na úrovni genu (DNA, mRNA),
eventuelně proteomu (proteiny)

Klasické sérové nádorové markery však mají
stále mají nenahraditelné místo

DNA - nádorové markery

- BRCA1 karcinom prsu
- p53 Li-Fraumeni syndrom
- K-ras kolorektální karcinom
- RB1 retinoblastom
- přestavby bcl-2 B lymfom
- přestavby c-abl-bcr leukémie

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, ...

Metody stanovení TM

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

Další metody používané pro diagnostiku nádorů

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

Budoucnost

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

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

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,..)

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)

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

Diagnostický rozhodovací limit Cut-off

- Pojmem cut-off se rozumí hodnota výsledku laboratorní zkoušky, která rozliší jedince s přítomností choroby od jedinců bez její přítomnosti s danou:
 - Senzitivitou a specificitou
 - Věrohodností
 - Prediktivní hodnotou
- Hodnota zvolená na bázi konsenzu odborníků

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 senzitivita (citlivost)

Udává procento správně pozitivních výsledků ze souboru nemocných.

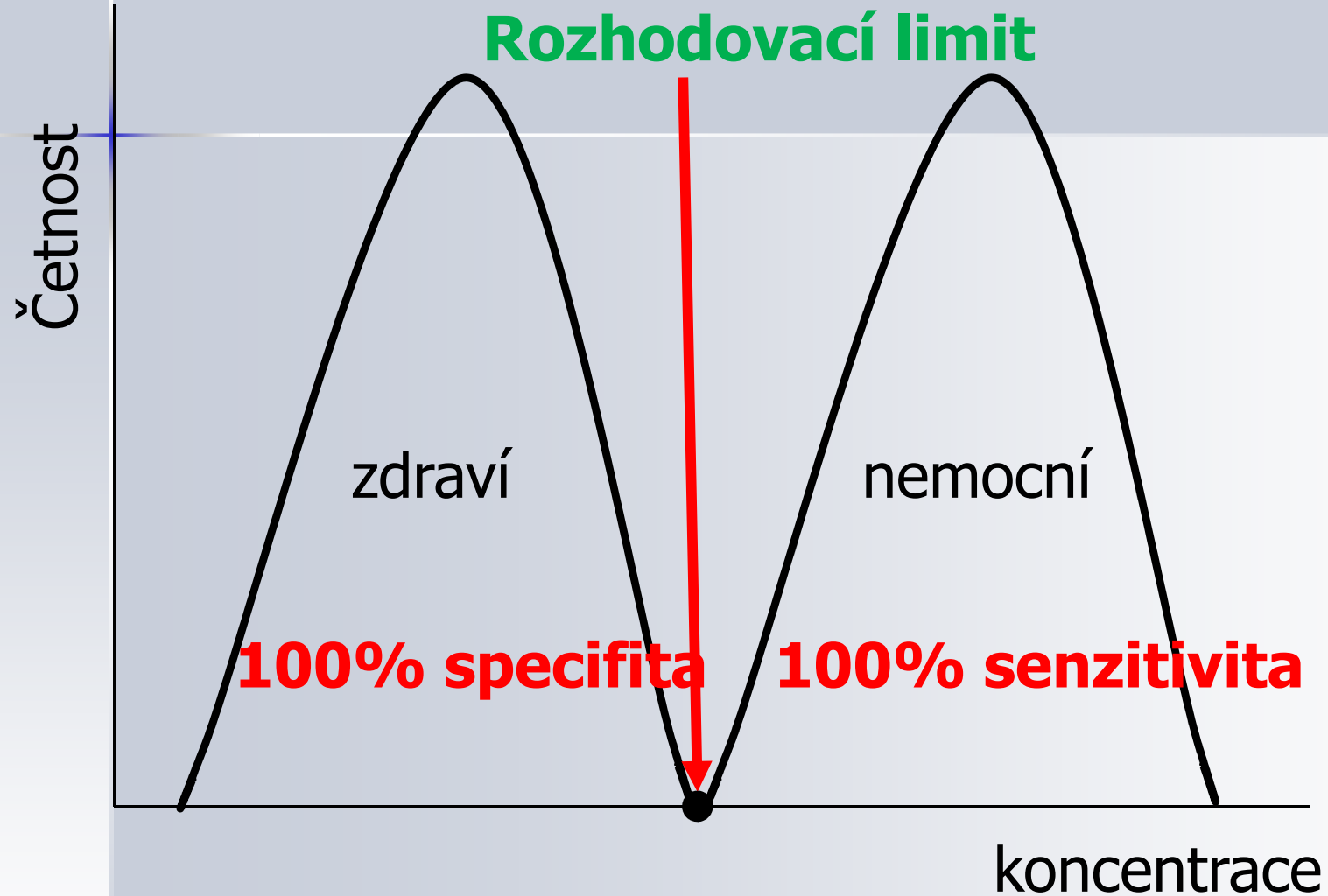
Čím vyšší senzitivita, tím je méně falešně negativních výsledků.

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

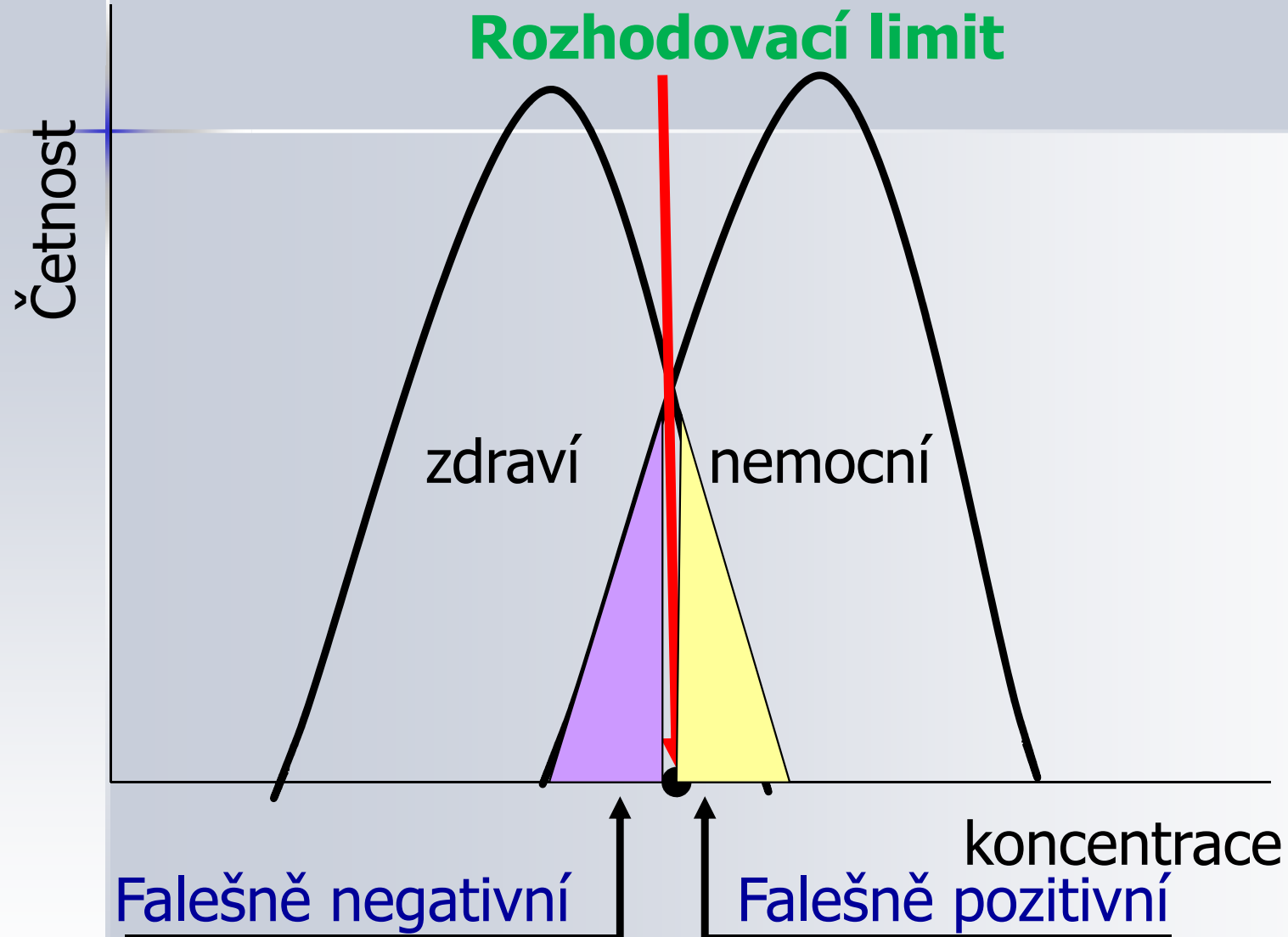
Doporučení: >50%

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

Ideální stav



Realita: smíšená populace



Hodnocení TU markerů pomocí ROC křivek

(ROC = receiver operating characteristic)

senzitivita (%)

100 %

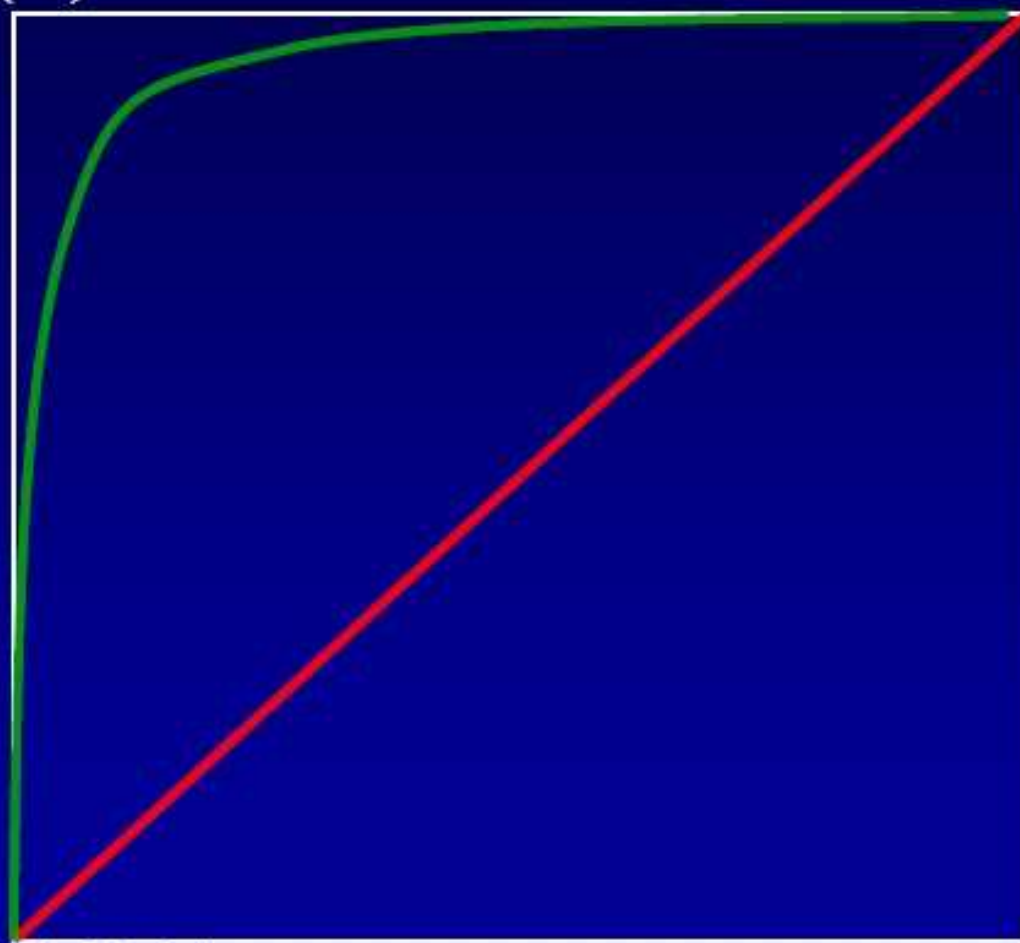
0 %

100 %

0 %

specifická (%)

- vhodný TU marker
- žádná diskriminace mezi zdravými a nemocnými



Příklad interpretace: Software BIANTA

(Bayesian Intelligent Associative Network for Tumor Analysis)

Software BIANTA decision support system for tumor marker interpretation in primary and suspect cancer diagnostics

Software Bianta is fuzzy probabilistic network for decision support in tumor marker interpretation in primary diagnostics - eg. for tumor of unknown origine. At picture is a classical phylosopher Bianta (Biás) who said: Omnia mea mecum porto-Everything what I have I carry with me.

Put patient ID or surname, first name


Level of cancer disease suspicion

Patient without clinical symptoma or screening

Patient with nospecific clinical symptoma

Patient with clear suspicion of tumor presence

Tumor of unknown origine



Confirmation

Version - D E M O

<i>Localization of proved metastases</i>	<i>Localization of supect metastases</i>
<input type="checkbox"/> bone	<input type="checkbox"/> bone
<input type="checkbox"/> lung	<input type="checkbox"/> lung
<input type="checkbox"/> liver	<input type="checkbox"/> liver
<input type="checkbox"/> pleura	<input type="checkbox"/> pleura
<input type="checkbox"/> CNS	<input type="checkbox"/> CNS
<input type="checkbox"/> ovary	<input type="checkbox"/> ovary
<input type="checkbox"/> omentum	<input type="checkbox"/> omentum
<input type="checkbox"/> kidney	<input type="checkbox"/> kidney
<input type="checkbox"/> peritoneum	<input type="checkbox"/> peritoneum
<input type="checkbox"/> other location	<input type="checkbox"/> other location

Příklad interpretace: Software **CRACTES**

(Cancer Recurrence, Analysis, Correlation, Testing, Statistics)

Stanovení pravděpodobnosti návratu choroby
nebo její progrese

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

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)

NSE

(neuronspecifická enoláza)

- Cytoplazmatický, glykolytický **izoenzym enolázy** (katalyzuje přeměnu 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát)
- Vyskytuje se jako dimer ($\alpha\gamma$ a $\gamma\gamma$)
- **Fyziologicky** je produkován v nervové a plicní tkáni vyvíjejícího se plodu, v dospělosti v různých strukturách neuroendokrinního původu

NSE

(neuronspecifická enoláza)

➤ *Zvýšené hodnoty:*

- malobuněčný **plicní karcinom**, nádory mozku (**neuroblastomy**) a neuroendokrinního systému (feochromocytom)

➤ *Nespecificky zvýšené hodnoty:*

- nemaligní plicní onemocnění, jaterní choroby, **hemolýza**, zranění mozku

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)

PSA

(prostata specifický antigen)

- *Referenční metoda:* není k dispozici
 - *CRM:* není k dispozici
- ke standardizaci se zatím používá standard WHO 96/670
- *TMU:* 15%
 - *Referenční hodnoty:*
 - do 49 let <2,5 µg/l
 - do 59 let <3,5 µg/l
 - do 69 let <4,5 µg/l
 - nad 69 let <6,5 µg/l

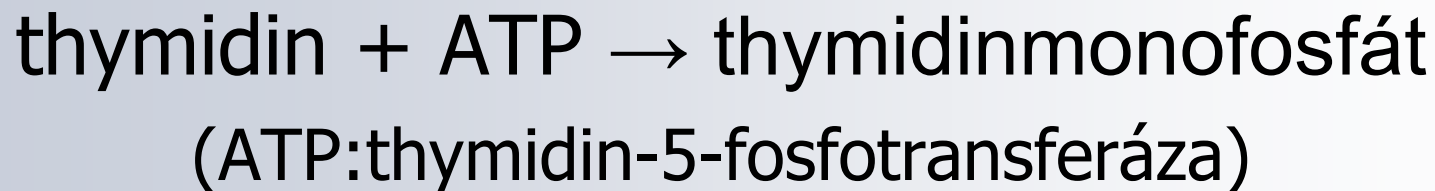


Volný PSA (FPSA)

- 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

TK (thymidinkináza)

- Enzym podílející se na syntéze DNA, umožňuje syntézu DNA náhradní cestou, ukazatel buněčné proliferace



- 2 izoenzymy: TK1 (fetální) v séru 95%
TK2 („dospělý“)

TK (thymidinkináza)

- **Zvýšené hodnoty:**
 - hematatoonkologické malignity, plicní karcinom, ca kůže
- **Nespecifické zvýšení:**
 - nemaligní plicní onemocnění, virové choroby, revmatické choroby, léčba některými cytostatiky (MTX)

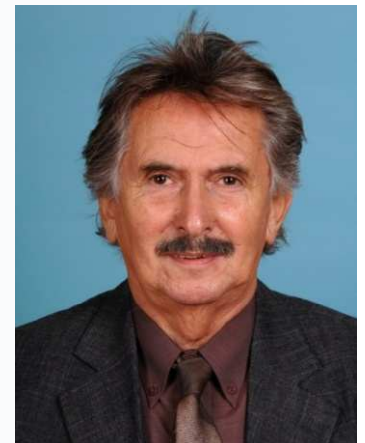
Onkofetální antigeny

➤ AFP

➤ CEA

AFP (alfa fetoprotein)

- Syntetizován již během vývoje plodu, mizí po porodu. Hlavním zdrojem je žloutkový vak, fetální játra a GIT.
- Glykoprotein (4% sacharidů, Mr 70 000) 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

AFP (alfa fetoprotein)

➤ *Referenční metoda:* není k dispozici

➤ *CRM:* není k dispozici

ke standardizaci se zatím používá standard
WHO 72/225 (IRMM BCR-486)

➤ *TMU:* 20%

➤ *Referenční hodnoty:* <10 ug/l

CEA

(Karcinoembryonální antigen)

- Fyziologicky je syntetizován během embryonálního a fetálního období. Hlavním zdrojem je povrch sliznic převážně v gastrointestinálním traktu a v pankreatu.
- **Glykoprotein** (50% sacharidů, 641 AK, Mr 180 000)
- 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

CA 19-9

- Izolován z buněk kolorektálního karcinomu hybridizační technologií
- Vyskytuje se jako glykoprotein ve tkáních (glykolipid) nebo v krvi (mucin) a sekretech
- Příbuzný antigenu krevní skupiny Lewis a/b
- Různé molekulové varianty
- Není nádorově ani orgánově specifický

CA 19-9

➤ *Zvýšené hodnoty:*

- diferencované ca pankreatu a žlučových cest, kolorektální ca, žaludek, játra

➤ *Nespecifické zvýšení:*

jaterní cirhóza, hepatitida, pankreatitida, onemocnění žlučových cest, diabetes,...

➤ 3-7% populace tento antigen netvoří (krevní skupina Lewis a/b negativní)

CA 19-9

- *Referenční metoda:* není k dispozici
- *CRM:* není k dispozici
- ke stanovení se používá monoklonální protilátka (1116NS 19-9, firma Centocor)
- *TMU:* SEKK (2008) 20%
- *Referenční hodnoty:* <35 kU/l

CA15-3

- **Glykoprotein** diferenciačního typu (ochrana epiteliálních struktur?), produkován především nádory žláзовého epitelu a epitelu mléčné žlázy
- **Zvýšené hodnoty:**
ca prsu, ovaria, děložního čípku, prostaty, plic a kolorektálního karcinomu
- **Nespecifické zvýšení:**
jaterní cirhóza, plicní choroby, GIT, renální poruchy

CA125

- Glykoprotein s vysokým obsahem sacharidů
- Syntetizován především v epiteliálních buňkách u ca ovárií
- **Zvýšené hodnoty:**
ca vaječníků (ovárií), gynekologické tumory, ca plic, hepatocelulární karcinom
- **Nespecifické zvýšení:**
gravidita, gynekologické choroby, GIT, selhání ledvin, chronické onemocnění jater

CA72-4

(tumor asociovaný antigen, TAG 72)

➤ Glykoprotein (mucinový komplex)

➤ Zvýšené hodnoty:

ca jícnu, GIT, žaludku, pankreatu,
ovaria, střeva

➤ Nespecifické zvýšení:

choroby jater, ledvin, zánětlivá onemocnění,
vředová choroba žaludku, GIT

Fragmenty cytokeratinů

- TPS
- TPA
- CYFRA21-1

TPA

(Tkáňový polypeptidový antigen)

- Antigen odpovídající solubilním fragmentům cytokeratinu 8,18,19)
- Marker proliferační aktivity nádorových buněk
- Zvýšení:
ca ledvin, močový měchýř, plíce, prsa
- Nespecifické zvýšení:
infekce, choroby jater, ozařování

TPS

(Tkáňový polypeptidový specifický antigen)

- Antigen odpovídající solubilním fragmentům cytokeratinu 18)
- Marker proliferační aktivity nádorových buněk
- Zvýšení:
ca ledvin, močový měchýř, plíce, prsa
- Nespecifické zvýšení:
infekce, choroby jater, ozařování

CYFRA 21-1

(solubilní fragment cytokeratinu)

- Epiteliální buňky skvamózního (epidermoidního) typu
- **Zvýšení:**
 - ca plic, močového měchýře, cervix, žaludku, pankreatu, prostaty, hlavy a krku
- **Nespecifické zvýšení:**
 - zánětlivá plicní onemocnění, infekce, TBC

hCG

(lidský choriogonadotropin)

- Glykoprotein tvořený podjednotkami alfa a beta (dimer)
- Může docházet k disociaci na podjednotky
- Beta podjednotka může být štěpena na gonadotropinový peptid (beta-core fragment)
- Stanovuje se: **celkový β -hCG** (dimer+volná β -podjednotka), **intaktní hCG** (bez volné β -podjednotky), **volná β -podjednotka, beta-core fragment**

hCG

(lidský choriogonadotropin)

- Syntetizován placentou ihned po početí
- Zvýšené hodnoty:
choriokarcinom, ca testes
- Nespecifické zvýšení:
těhotenství, cysty ovarii

SCCA

(Antigen skvamózních buněk)

- Za fyziologického stavu je produkován diferencovanými epidermoidními buňkami plodu i dospělých osob (glykoprotein)
- **Zvýšené hodnoty:** (ca buněk dlaždicového epitelu)
 - ca děložního čípku a další gynekologické nádory, nádory ORL oblasti (hlava, krk)
- **Nespecifické zvýšení:**
gynekologické, plicní a jaterní choroby

Ferritin

- Protein podílející se na regulaci homestázy železa, slouží k uskladnění železa ve tkáních
 - *Zvýšené hodnoty:*
 - **hematoonkologické malignity**,
lymfomy, mnohočetný myelom, plíce, melanom, játra, slinivka, prs, varle
 - *Snížené hodnoty:*
 - anémie z nedostatku železa
- Také:
- akutní záněty, hemosideróza, hemochromatóza

Beta-2-mikroglobulin, B2M

➤ Zvýšené hodnoty:

- krevní malignity (mnohočetný myelom, chronická lymfocytární anémie)

Nespecifické zvýšení:

- postižení ledvin, revmatoidní arthritida, imunodeficience

Další TM

- S-100B
- Chromogranin A (CgA)

Monoklonální imunoglobuliny

➤ Paraproteiny

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

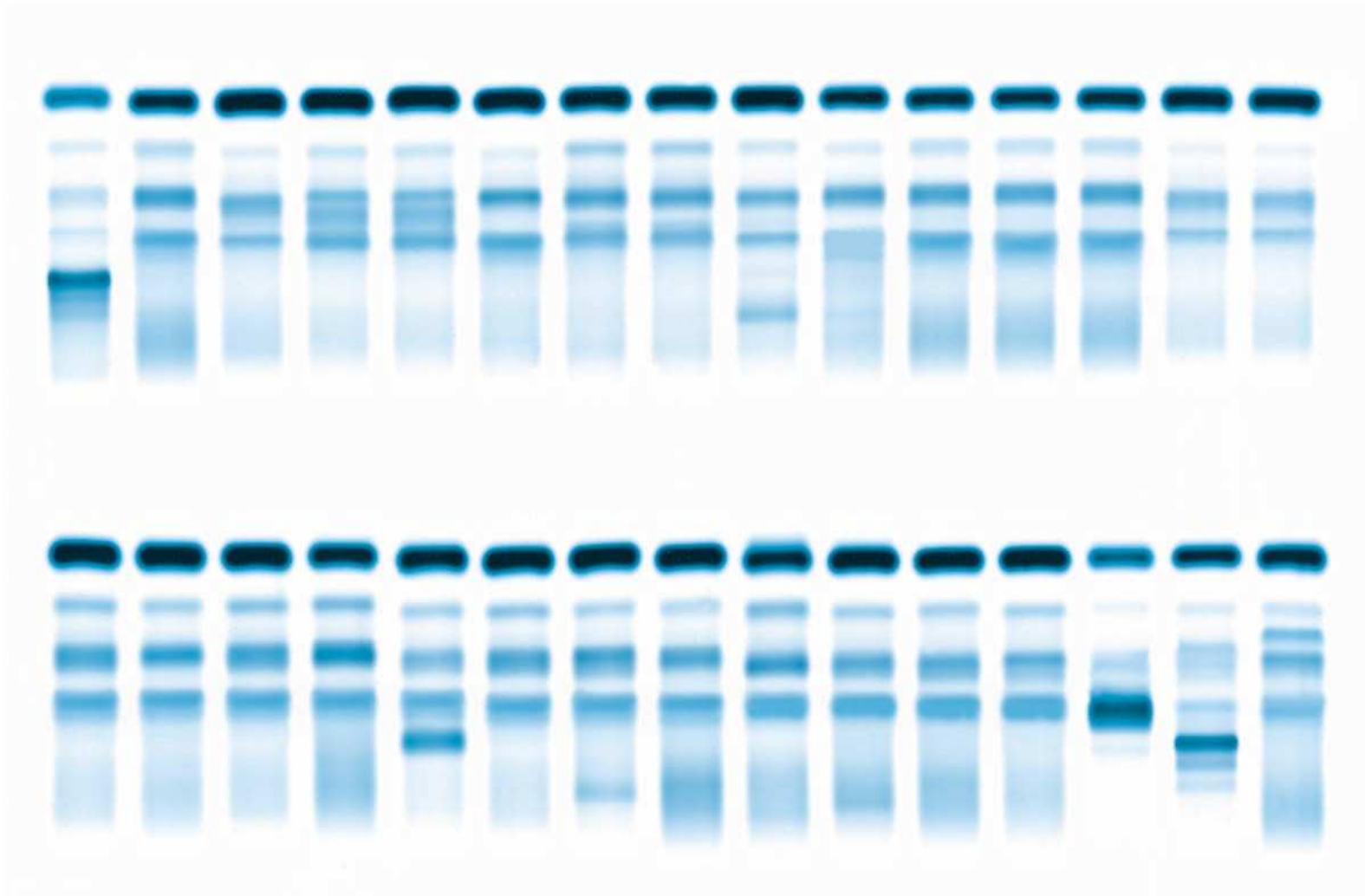
➤ Volné lehké řetězce

(Bence-Jonesova bílkovina v moči)

HYDRAGEL PROTEIN(E) 15/30

sebia

16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

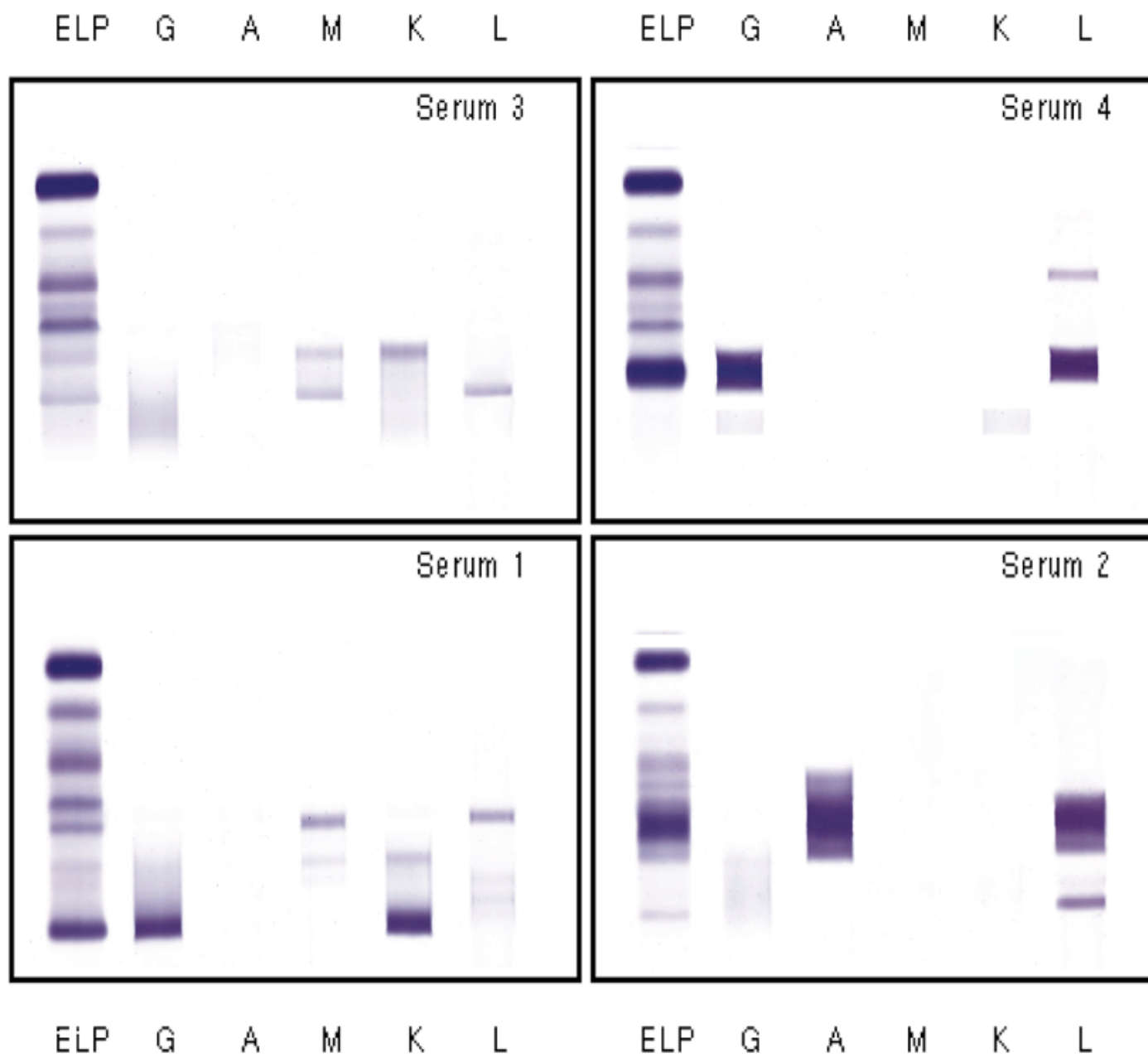


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

sebia

HYDRAGEL 4 IF

sebia



Hormony a jejich metabolity

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



Závěr

Nádorové markery nelze přeceňovat,
ale ani zatracovat.