

Nádorové (tumorové) markery

Petr Breinek



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**

Nádorem asociované antigeny-
nádorově specifické antigeny a s
nádorem asociované antigeny)

✓ **Jinými tkáněmi** jako jejich
odpověď na přítomnost nádoru

Indukované TM

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)**-neproniká do okolních tkání ani se nešíří do jiných částí těla
- **Maligní (zhoubné)**
 - **karcinomy** (epiteliální nádory)
 - **sarkomy** (mesenchymální původ)
 - **hematologické nádory**

Často vytvářejí **metastázy** =druhotné ložisko maligního nádoru, které vzniká šířením nádorových buněk přímým prorůstáním, krevním oběhem nebo lymfatickou cestou)

Mezinárodní klasifikace maligních nádorů (TNM)

- T** rozsah primárního nádoru
- N** stav regionálních uzlin (metastáz)
- M** přítomnost vzdálených metastáz

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)

Steroidní receptory (estrogenové, progesteronové)

Receptory růstových faktorů

Onkoproteiny (Her-2/neu)

Produkty supresorových genů (p53)

Proteinázy

Tkáňové a buněčné 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, ...

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, TK, CEA)

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

5. Enzymy (NSE, TK, LD)

6. Specifické proteiny (ferritin, beta2-mikroglobulin, monoklonální imunoglobuliny volné lehké řetězce kapa a lambda)

7. Receptory (estrogenové, progesteronové, růstových hormonů)

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)

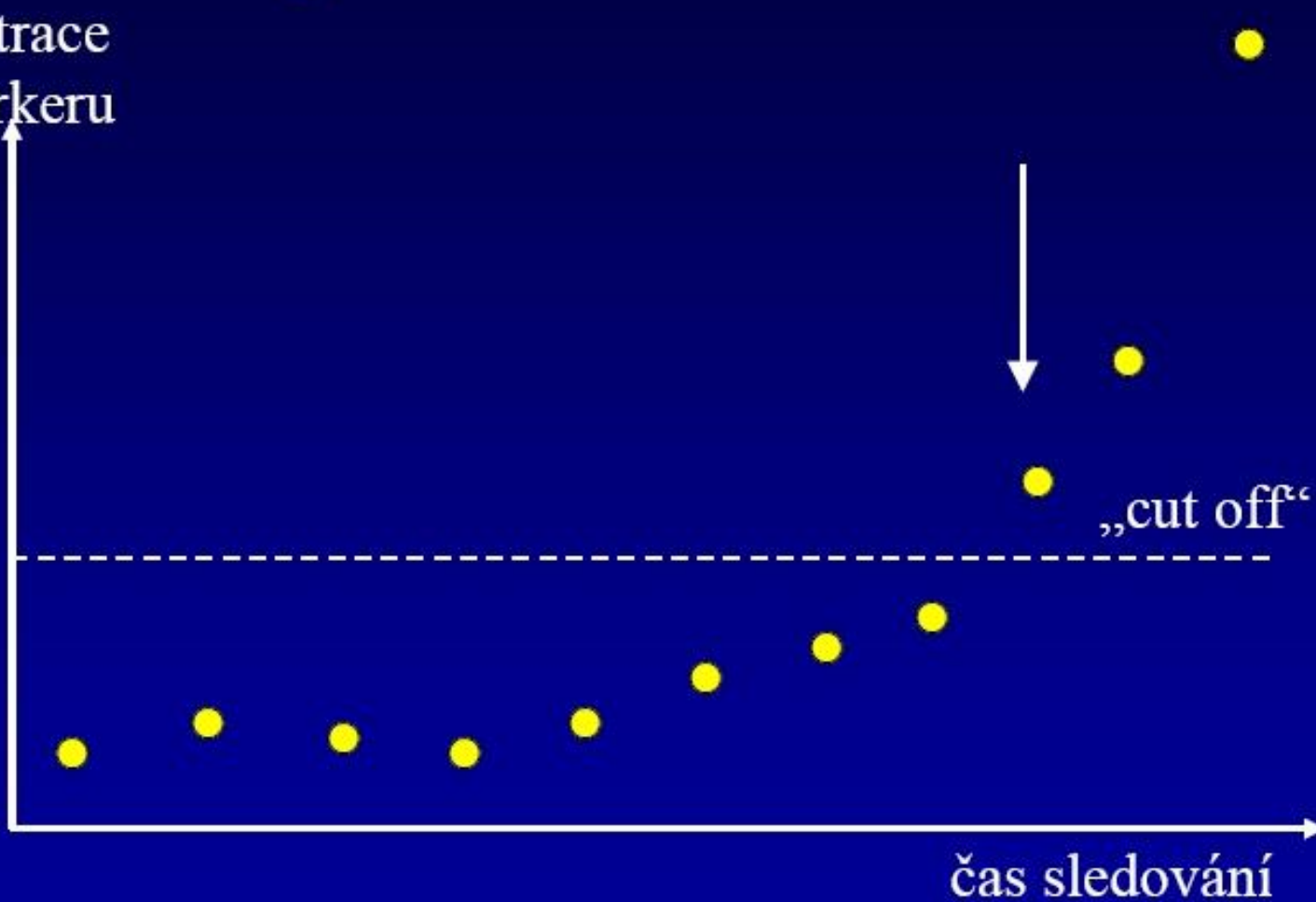
Vznikne z **protoonkogenu**, který po aktivaci je schopen vyvolat neoplastickou transformaci

Jaký je význam stanovení TM?

- ✓ Sledování efektu terapie
- ✓ Včasný záchyt progresu a recidivy choroby
- ✓ Rozlišení mezi benigním a maligním nádorem
- ✓ Určení stádia onemocnění
- ✓ Odhad prognózy

Dynamické sledování

koncentrace
TU markeru
v krvi



Screening a primární diagnostika

U asymptomatických vyšetřovaných

**Většina nádorových markerů
není k tomuto účelu vhodná**

Diagnostické využití (1)

Doporučení odborných společností

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

Diagnostické využití (2)

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, B₂M	paraprotein

Doporučené nádorové markery vhodné pro monitorování průběhu choroby a účinnosti terapie

Nádor – lokalizace		Markery základní	Markery doplňkové
tlusté střevo		CEA , CA 19-9	
žaludek		CA 72-4 , CEA	
jícen	Horní třetina	SCC	CYFRA 21-1
	Dolní třetina	CA 72-4 , CEA	
pankreas		CEA , CA 19-9	
játra a žlučník	hepatom	Alfa-1-fetoprotein CEA	
	cholangiocelulární metastázy	CA 19-9 CEA	
prs		CA 15-3 , CEA CA 125 , HE4	TPA (TPS) TPA (TPS)
vaječníky	nemucinózní	CA 19-9 , CA 72-4	CEA
	mucinózní	Alfa-1-fetoprotein	
	germinativní	hCG	
děložní čípek	epidermoidní	SCC	CEA , CYFRA 21-1
	adenokarcinomy	CEA	
děloha		CA 15-3	CEA
vulva		SCC	
ledviny		CEA , TPA (TPS)	NSE
močový měchýř		TPA (TPS)	CYFRA 21-1
prostata		PSA , PSA volný	ACP
testes	seminomy	hCG , Alfa-1-fetoprotein	NSE , SP1
	neseminomy	hCG , Alfa-1-fetoprotein	
Karcinoid		HIOK , NSE	
nadledviny – kůra		17-ketosteroidy	17-hydroxysteroidy
štítná žláza	diferencované	TG	
	medulární	Kalcitonin , CEA	NSE
	anaplastické	TPA (TPS)	
Melanom		Melanogeny NSE	S-100 protein , Thymidinkináza
plice	SCLC	CEA , NSE	TPA (TPS)
	NSCLC	CYFRA 21-1 , CEA	SCC
hlava a krk		CEA	SCC , CYFRA 21-1
centrální nervový systém	neuroblastomy	NSE	
	gliomy	CEA	
	astrocytomy	Thymidinkináza	
leukémie		Thymidinkináza Feritin	
lymfom	hodgkinský	Beta-2-mikroglobulin Feritin	
	non-hodgkinský	Beta-2-mikroglobulin Thymidinkináza	

lymfom	hodgkinský	Beta-2-mikroglobulin Feritin	
	non-hodgkinský	Beta-2-mikroglobulin Thymidinkináza	
mnohočetný myelom		Beta-2-mikroglobulin paraproteiny	

**Negativní nález neznamená
nepřítomnost nádoru!**

a naopak

**Pozitivní nález neznamená
přítomnost zhoubného
nádoru!**

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

Preanalytická fáze

Pravidla pro odběr/výběr TM

- ✓ Typ TM je dán **lokality nádoru**
- ✓ **Frekvence** podle uvedených zásad (poločas, doporučené časování)
- ✓ Respektovat **doporučení odborných společností**
- ✓ Obvykle sérum, není-li vyžadováno jinak
- ✓ Nutná **kontrola preanalytických vlivů při odběru**

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)

Metody stanovení TM

- 1. Imunoanalytické metody**
- 2. Metody molekulární biologie**
- 3. Metody chemické**

Stanovení enzymů

Metody chromatografické

Metody elektroforetické

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

Další metody používané pro diagnostiku nádorů

- Imunohistochemie (tkáně z bioptických vzorků)
- Biofyzikální (rtg, CT, Sono, PET)
- Průtoková cytometrie

Referenční rozmezí ?

Cut-off / diagnostický rozhodovací limit (diskriminační hodnota)

Je to hodnota výsledku laboratorní zkoušky, která rozliší jedince s přítomností choroby od jedinců bez její přítomnosti s danou:

Senzitivitou a specificitou

Prediktivní hodnotou

Věrohodností

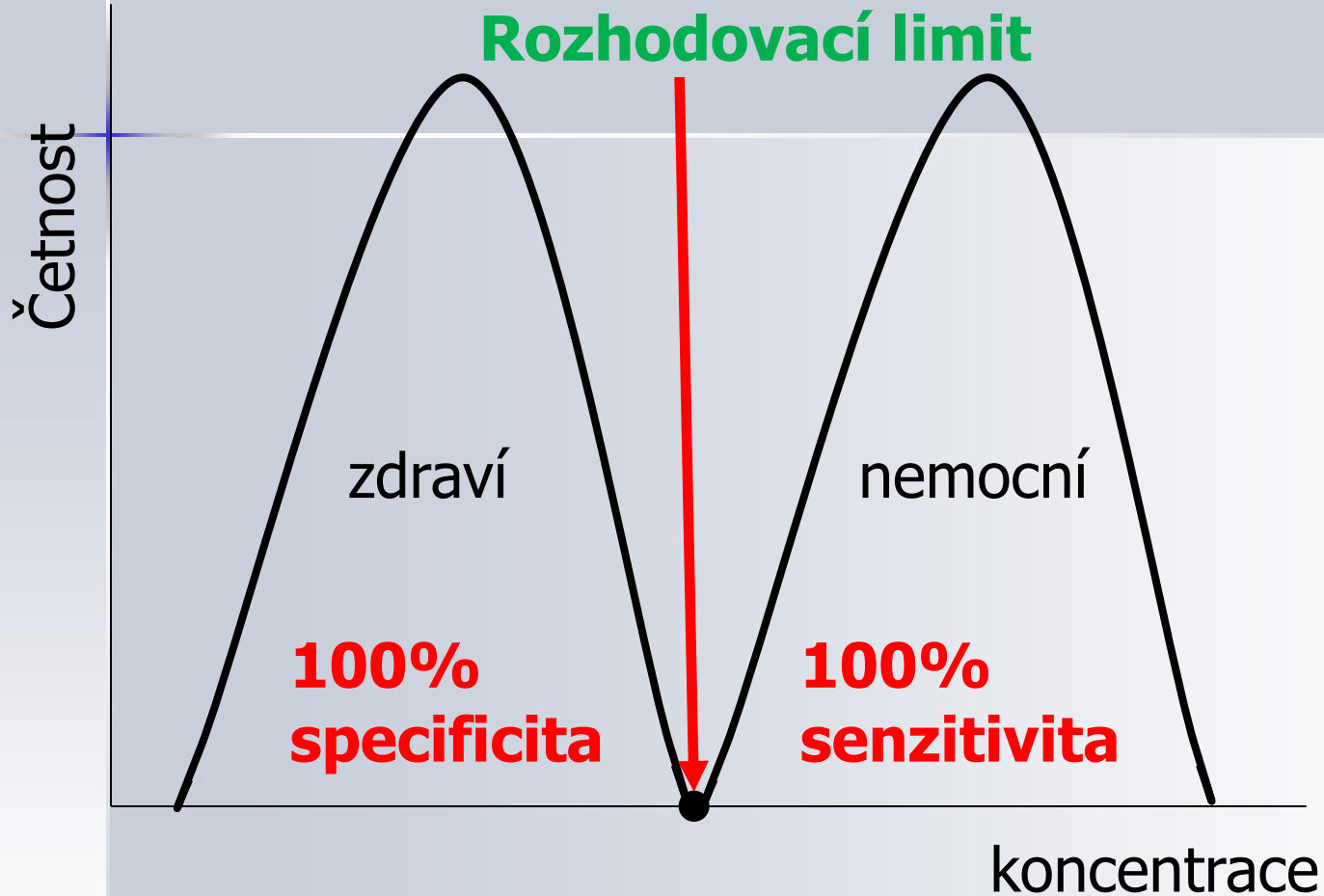
Hodnota zvolená na bázi konsenzu odborníků

Analytická senzitivita a specificita

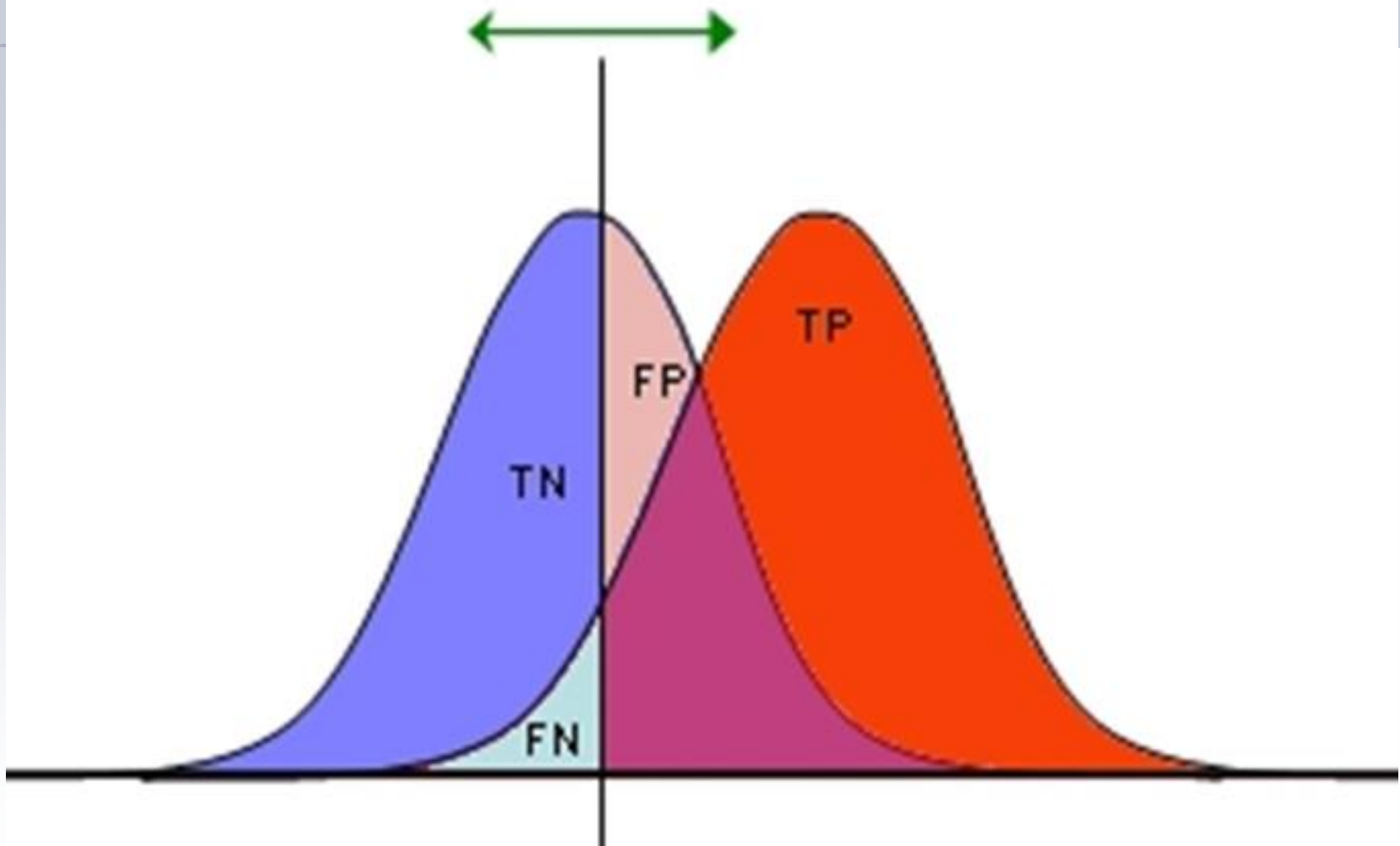
Senzitivita – schopnost stanovit nízké koncentrace stanovovaného analytu

Specificita – schopnost stanovit právě a jen konkrétní analyt

Ideální stav



Realita: smíšená populace



Klinická specificita (specifičnost)

Udává procento správně negativních výsledků ze souboru zdravých.

Pravděpodobnost, že zdravý nebude testem zachycen

Čím vyšší specificita, tím je méně falešně pozitivních výsledků.

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

Doporučení: >95%

Příklad: Specificita

1) Test má 95% specificitu

Co to znamená?

- ✓ Z 10 000 zdravých označí test 500 zdravých mylně za nemocné (FP, specificita)

Klinická senzitivita (citlivost)

Udává procento správně pozitivních výsledků ze souboru nemocných.

Pravděpodobnost, že nemocný bude testem zachycen

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%

Příklad: Senzitivita

1) Test má 95% senzitivitu

Co to znamená?

- ✓ Z 10 000 nemocných test označí 500 nemocných mylně za zdravé (FN, senzitivita)

2) Doporučení: Test má >50% senzitivitu

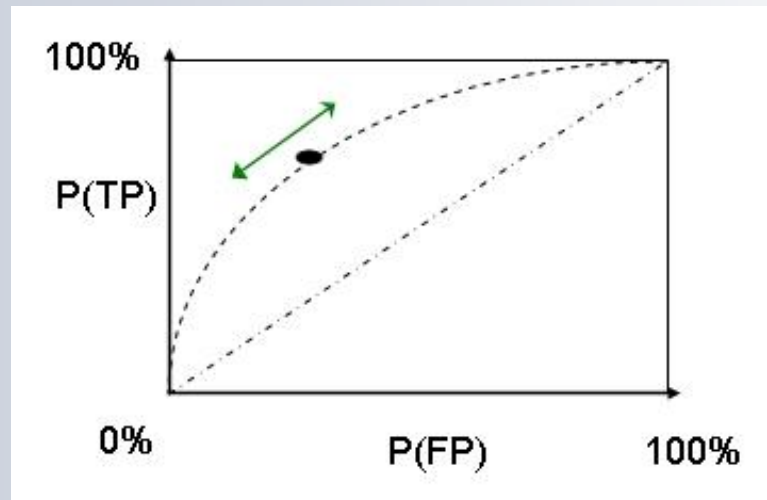
Co to znamená?

- ✓ Z 10 000 nemocných test označí 5 000 nemocných mylně za zdravé (FN, senzitivita)

ROC analýza a ROC křivka

- ✓ **ROC analýza** (*receiver operating characteristic analysis*) je statistický postup vyhodnocování signálů správné/falešné positivity a falešné/správné negativity.
- ✓ **ROC křivka** (*receiver operating characteristic curve*) obvykle znázorňuje vztah mezi senzitivitou a (1 – specificitou), tj. vztah mezi správnou pozitivitou a falešnou pozitivitou

ROC křivky se využívají na určení rozhodovacích limitů (cut-off) a na porovnávání alternativních testů.

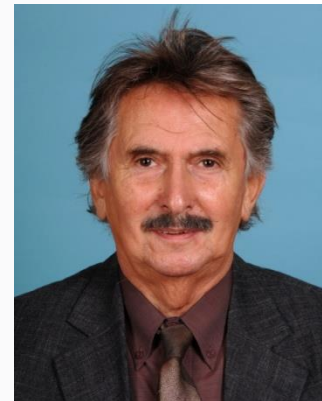


Onkofetální antigeny

- AFP
- CEA

AFP (Alfa-1-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

- Součást screeningu vrozených vývojových vad (v 2. trimestru) – ukazatel fyziologického vývoje těhotenství
- *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 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, mléčné žlázy, jater, ...

➤ *Nespecifické zvýšení:*

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

Proliferační a diferenciační antigeny

- PSA
- TPS
- TK

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)

- *Referenční metoda:* není k dispozici
 - *CRM:* není k dispozici
- ke standardizaci se zatím používá standard WHO 96/670
- *TMU:* 15%
 - *Rozhodovací limit:*
- | | | |
|---|----------|-----------|
| A | do 49 r | <2,5 µg/l |
| | do 59 r | <3,5 µg/l |
| | do 69 r | <4,5 µg/l |
| | nad 69 r | <6,5 µg/l |
- B
<4,0 µg/l

Volný PSA (FPSA)

- Zvýšená specifita vyšetření
- **Poměr (FPSA/PSA) . 100**
pro „šedou zónu“ PSA 4-10 µg/l
- **0-15% malignita**
- 15-25% malignita i benigní hyperplazie
- **nad 25% benigní hyperplazie**

TPS

(Tkáňový polypeptidový **specifický** antigen)

- Antigen odpovídající rozpustným fragmentům cytokeratinů 8 a 18
- Marker **proliferační aktivity** nádorových buněk
- Zvýšení:
ca ledvin, **močový měchýř**, plíce, prsa
- Nespecifické zvýšení:
infekce, choroby jater, ozařování

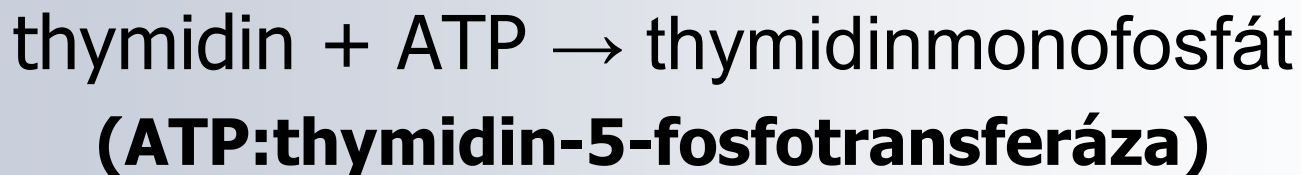
TPA

(Tkáňový polypeptidový antigen)

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

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:

- **hematoonkologické malignity** (akutní leukémie a nehodgkinské lymfomy), plicní karcinom, ca kůže

➤ Nespecifické zvýšení:

- nemaligní plicní onemocnění, virové choroby, revmatické choroby, léčba některými cytostatiky (MTX)

Karbohydrátové molekuly s epitopy rozpoznávané pomocí mAb

- **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
5-10% populace tento antigen netvoří
- **Není nádorově ani orgánově specifický**

CA15-3

- **Glykoprotein** diferenciačního typu
produkován v dospělosti v epiteliálních buňkách
vývodů mléčné žlázy, slinných žláz a bronchů
- **Zvýšené hodnoty:**
ca prsu, ovaria, děložního čípku, prostaty,
plic a kolorektálního karcinomu
- **Nespecifické zvýšení:**
benigní onemocnění prsu, jaterní cirhóza,
plicní choroby, GIT, renální poruchy

CA125

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

HE 4

(Human Epididymal Protein 4)

Je produkován ve vysokých koncentracích u pacientek s ca vaječnicků

➤ Zvýšené hodnoty:
ca vaječnicků

CA 72-4

(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

Hormony a jejich metabolity

- **hCG**
- PTH
- ACTH
- Kalcitonin
- Gastrin
- Prolaktin
- Katecholaminy a metanefriny
- Tyreoglobulin (TG)

hCG

(Lidský choriogonadotropin)

➤ Glykoproteinový hormon tvořený podjednotkami alfa a beta (dimer), může docházet k disociaci na podjednotky, beta podjednotka může být štěpena na močový gonadotropinový peptid (beta-core fragment)

➤ **Stanovuje se:**

Celkový β -hCG (intaktní hormon-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, ca ovaríí
- **Nespecifické zvýšení:**
Fyziologicky v **těhotenství**, cysty ovaríí, myomy

Fragmenty cytokeratinů

- TPS
- TPA
- **CYFRA21-1**

CYFRA 21-1

(Solubilní fragment cytokeratinu 19)

- Vzniká v epiteliálních buňkách skvamózního (epidermoidního) typu
- Zvýšení: monitorování průběhu onemocnění a úspěšnosti terapie
 - **ca plic, močového měchýře**, cervix, žaludku, pankreatu, prostaty, hlavy a krku
- Nespecifické zvýšení:
zánětlivá plicní onemocnění, infekce, TBC,...

Enzymy

- LD (laktátdehydrogenáza)
- **NSE** (nespecifická enoláza)
- PSA (prostatický specifický antigen)
- TK (thymidinkináza)
- Tumor M2-PK (izoenzym pyruvátkinázy)

LD

(Laktátdehydrogenáza)

Cytoplasmatický enzym, který katalyzuje reakci anaerobní glykolýzy, to vysvětluje přítomnost LD ve všech tkáních ($\text{pyruvát} + \text{NADH} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{laktát} + \text{NAD}^+$)

Zvýšení jeho aktivity v krvi není orgánově specifické → stanovení dnes **slouží spíše k vyloučení onemocnění**

Doplňkový marker pro monitorování nemocných s nehodgkinskými lymfomy, leukémií, i dalších nádorů

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** (SCLC),
nádory mozku (**neuroblastomy**) a
neuroendokrinního systému
(feochromocytom)

➤ *Nespecificky zvýšené hodnoty:*

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

Další TM

- B2M (Beta-2-mikroglobulin)
- Monoklonální imunoglobuliny
- S-100B
- Chromogranin A (CgA)

Beta-2-mikroglobulin, B2M

➤ Zvýšené hodnoty:

- systémové onemocnění B-lymfocytárního systému (mnohočetný myelom, chronická lymfocytární anémie,...)

Nespecifické zvýšení:

- postižení ledvin, chronické zánětlivé autoimunitní onemocnění

S-100 beta

- Poprvé popsán v centrálním nervovém systému, skládá se z podjednotek α a β .
- Zvýšené hodnoty:
 - Maligní **melanomy**
- Nespecifické zvýšení:
akutní poškození mozku, kostní zlomeniny, záněty a infekce

Chromogranin A (CgA)

- Kyselý glykoprotein vyskytující se v neuroendokrinních tkáních
- Zvýšené hodnoty:
 - neuroendokrinní malignity
- Nespecifické zvýšení:
terapie kortikoidy, ledvinné a jaterní choroby

Monoklonální imunoglobuliny

➤ Paraproteiny

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

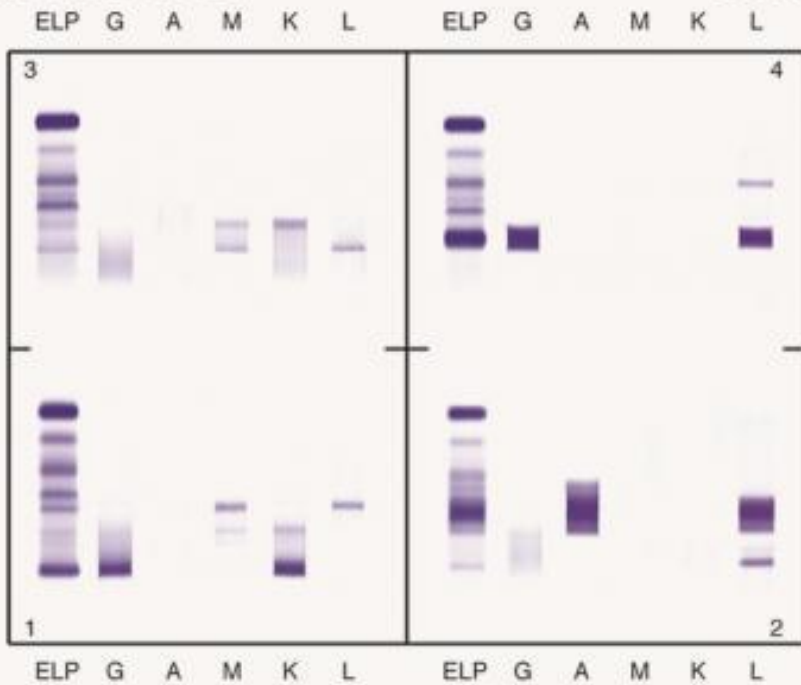
➤ Volné lehké řetězce

(Bence-Jonesova bílkovina v moči)

Imunofixace

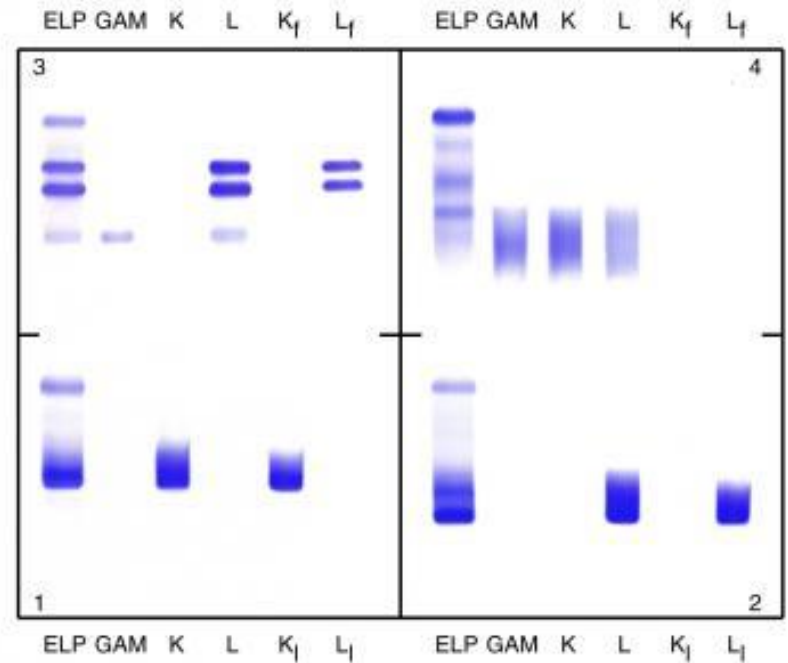
HYDRAGEL IF 2/4

sebia



HYDRAGEL BENCE JONES 2/4

sebia



Hemoglobin ve stolici

➤ Kolorektální karcinom

Genetické markery

- mutace genu BRCA1 (17.chromozom)
- mutace genu BRCA2 (13.chromozom)
nositelky mají až 80% pravděpodobnost vzniku
nádoru prsu
- p53