

# Laboratorní vyšetření pacientů se zhoubnými nádory se zaměřením na nádorové markery

Dalibor Valík,

Lenka Zdražilová Dubská

# Maligní onemocnění

- Vykazuje obvykle řadu laboratorně zjistitelných abnormalit, jež jsou svým charakterem nespecifické
- Často dochází k situaci, že tyto abnormality mohou předcházet vývoji manifestního onemocnění – někdy po dlouhou dobu

# Diferenciální diagnosa z laboratorního pohledu – nejvýznamnější nálezy

- anémie, trombocytopenie,
- Změněné jaterní testy, např. LDH
- Elektroforéza sérových bílkovin (M-spike)
- Tendence k hyperkoagulaci
- Zvýšená sedimentace

# Problém časně detekce rakoviny

- Limitace existujících metodologií (sensitivita VERSUS specificita)
- Celulární kinetika:
  - $10^6$  buněk = 1 mg nádoru
  - 10 buněk = 1 ng nádoru

# Situace, které nastávají v reálném životě častěji

- $10^{12}$  buněk= i.e 1 kg tumoru (!)
- ...detekce pomocí PET je slibným nástrojem za předpokladu, že tumor ochotně vychytává radiofarmakum

# Monitorování akutní toxicity

- Cytotoxická terapie indukuje rychlý buněčný rozpad
- Tento rozpad vyústí v:
  - hyperkalémii, hyperurikémií, hyperfosfatémií
- Může vyvolat akutní reální selhání
  - zvýšený kreatinin a urea

# snahy objevit ideální nádorový marker...

- Ideální nádorový marker by měl být:
  - specifický pro daný typ nádoru nebo pro malignitu obecně
  - dostatečně citlivý pro časnou diagnosu pro účely screeningu

- ...tyto předpoklady nejsou bohužel u většiny nádorových markerů splněny



# Co jsou nádorové markery ?

- enzymy: (LDH, NSE, PSA etc)
- hormony: katecholaminy, hCG, ACTH
- onkofetální antigeny: AFP, CEA,
- „specifické“ antigeny: CA15-3, CA19-9, CA125
- hormonální receptory
- genetické markery: onkogeny, tumor supresory

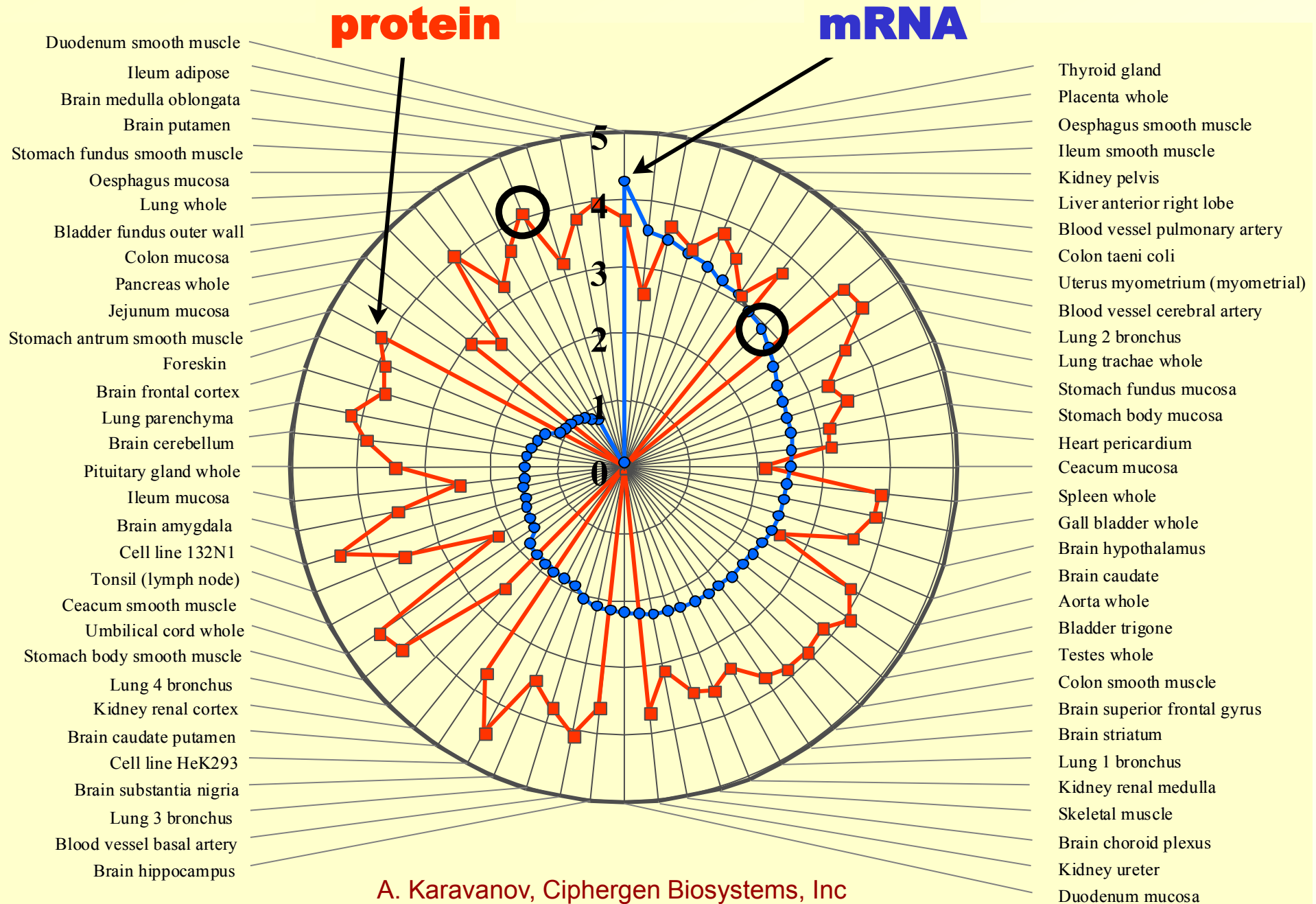
# Stručná historie

- 1847:
  - Bence-Jones protein
    - precipitated protein in acidified boiled urine
      - (monoclonal light chain)
- 1896 G. Beatson, castration and breast cancer
- 1928 ectopic hormone syndrome (ACTH-like)
- 1930 hCG discovered
- 1962 hormone receptors (ER-alpha)
- 1985 Knudson - a two hit hypothesis

# „...omiky 2007“ a tumor markery

- Genomické: BRCA1,2
- Transcriptomické: různé mRNA
- Proteomické: proteiny, enzymy
- Metabolomické: hormony, metabolity
- Celulomické: hrubé celulární aberace
  - (chromosomální, endoreduplikace, etc: i.e. RS buňky)

**Biomarkers: one housekeeping gene + its protein product and mRNA in tissues**



A. Karavanov, CIPHERGEN Biosystems, Inc

# Tumor markery: užití v klinice

- Populační screening
- Diferenciální diagnosa
- Prognostické indikátory
- Monitoring odpovědi na terapii
- Detekce návratu choroby

# Summary of Key Guideline Recommendations for the use of CA 125



<b>Screening</b>	N		N <sup>i</sup>	N	N <sup>m</sup>	N
<b>Diagnosis/ Case- finding</b>	N <sup>i</sup>		N <sup>i</sup>	N	N <sup>i</sup>	Y
<b>Staging/ Prognosis</b>	Y	N	Y	Y	Y	Y
<b>Detecting recurrence</b>	Y		Y	Y	Y	Y
<b>Monitoring therapy</b>	Y		Y		Y	Y

Y = Recommended by the organization

Source: Sturgeon, C. Practice Guidelines for Tumor Marker Use in the Clinic. *Clinical Chemistry* 48:8, 1151-1159. 2002.

N = Not recommended by the organization

N<sup>i</sup> = Only if CEA is increased at presentation and CA 125 is not

N<sup>m</sup> = In combination with transvaginal sonography, CA 125 may have a role in the early detection of ovarian cancer in women with a hereditary ovarian cancer syndrome.

ACBI = Association of Clinical Biochemists in Ireland; AJCC = American Joint Committee on Cancer; EGTM = European Group on Tumor Markers; ESMO = European Society for Medical Oncology

NACB = National Academy of Clinical Biochemistry; SOR = Standards, Options, and Recommendations

# Tumor markery: analytické metody

- Kvantitativní imunoanalýza
  - dnes hlavní analytický přístup
- Manuální ELISA
- Určení aktivity enzymů
- Určení vazebné kapacity
- Chromatografické techniky a hmotnostní spektrometrie

# Karcinoembryonální antigen (CEA)

- glykoprotein (MW 180,000D)
- má 6 antigenních determinant
- Je produkován během embryonálního vývoje v GIT fétu
- Hladiny jsou zvýšené u kuřáků
- Je zvýšen u kolorektálního karcinomu, karcinomu pankreatu, prsu, plic, žaludku
- Jeho hlavní klinické využití: detekce návratu choroby a efektu terapie.



# Alfa-fetoprotein (AFP)

- glykoprotein (MW 70,000D)
- Objevuje se v žloutkovém vaku, fetálních játrech a GIT, jeho funkce je neznáma (fetální analog albuminu ?)
- Peak ve fetálním séru mezi 12-16 týdnem
- Používá se pro:
  - diagnostiku NTD and trisomie 21
  - diagnosu a monitoring hepatocelulárního karcinomu
  - monitoring terapie germinálních tumorů (testikulárních a ovariálních nádorů)
  - pro screening HBs-positivní hepatitidy (2x/year)

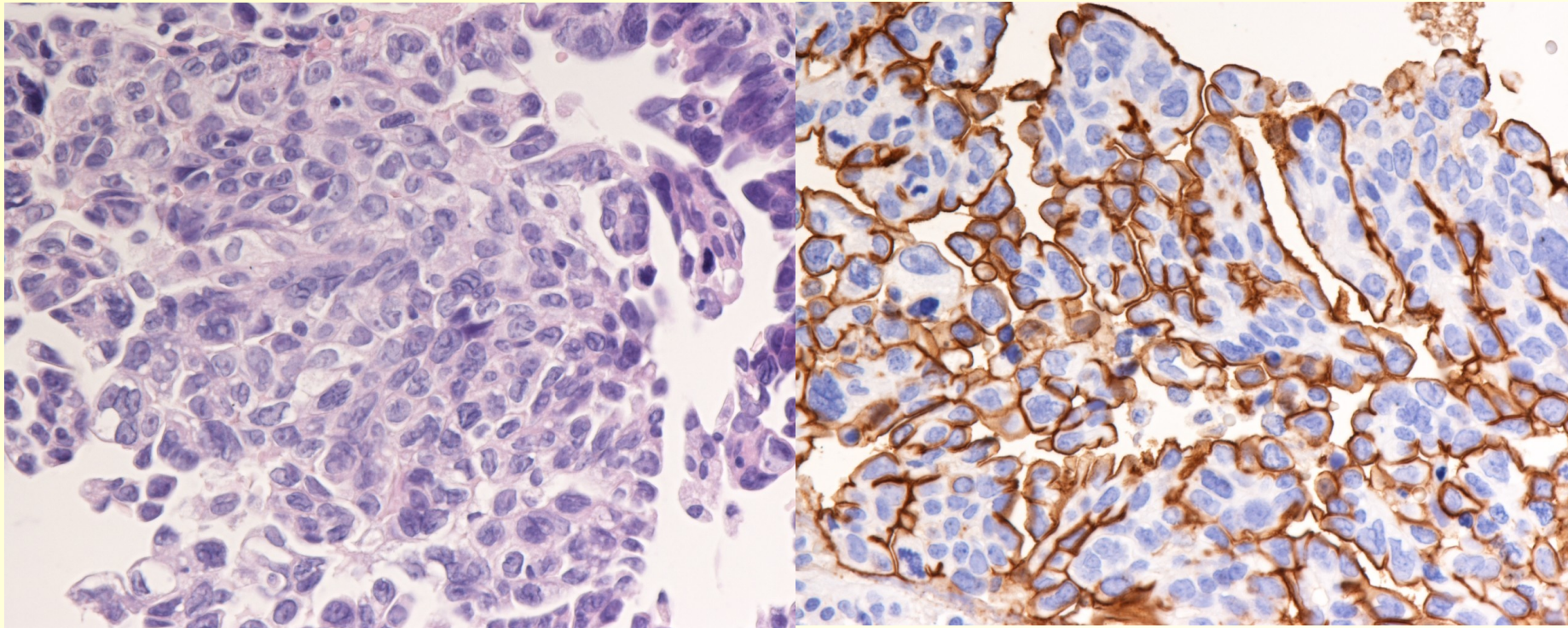
# Cancer antigen 15-3 (CA 15-3)

- **mucin-glykoprotein MUC1 (MW 300,000D)**
  - využívá se zejména u karcinomu prsu
- **Epitopes of MUC1 denoted CA15-3 (Europe) and CA27-29 (U.S.)**
- **Použití zejména pro monitorování terapie a detekci návratu choroby u karcinomu prsu**
- **Jeho koncentrace jsou často zvýšené i u jiných pokročilých malignit (ovarium, cervix, atd.)**

# Cancer antigen 125 (CA 125)

- **Jde o diferenciační antigen z coelomového epitelu**
  - Zejména se zvyšuje u ovariálních nádorů
- **užití ve sledování efektu terapie, kde má sensitivitu až 80% při 90% specificitě)**
- **vyskytuje se ovšem řada falešných pozitivit – ascitická tekutina, jaterní poškození, cholestáza, jakýkoli proces v omentu (zánět, atd)**

## Poorly differentiated serous ovarian cancer



Hematoxylin/eosin

CA125 immunostaining  
with presurgery serum concentration  
of 5404 U/ml (AxSYM)

## International organizations recommend the use of CA125 in management of ovarian cancer



Screening	N		N <sup>i</sup>	N	N <sup>m</sup>	N
Diagnosis/Case-finding	N <sup>i</sup>		N <sup>i</sup>	N	N <sup>i</sup>	Y
Staging/Prognosis	Y	N	Y	Y	Y	Y
Detecting recurrence	Y		Y	Y	Y	Y
Monitoring therapy	Y		Y		Y	Y

Source: Sturgeon, C. Practice Guidelines for Tumor Marker Use in the Clinic. *Clinical Chemistry* 48:8, 1151-1159. 2002.

Y = Recommended by the organization

N = Not recommended by the organization

N<sup>i</sup> = Only if CEA is increased at presentation and CA 15-3 is not

N<sup>m</sup> = In combination with transvaginal sonography, CA 125 may have a role in the early detection of ovarian cancer in women with a hereditary ovarian cancer syndrome.

AJCC = American Joint Committee on Cancer; EGTM = European Group on Tumor Markers; ESMO = European Society for Medical Oncology

NACB = National Academy of Clinical Biochemistry; SOR = Standards, Options, and Recommendations

# Carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9)

- marker volby u karcinomu pankreatu (82 % sensitivita)
  - pacienti s variantou krevní skupiny sialyl-Lewis a-b neprodukují CA19-9 (3-7% populace)
- **Je také zvýšen u gastrointestinálních tumorů a u mucinosních ovariálních nádorů**
  - vylučuje se žlučí – cholestáza může tedy působit falešnou pozitivitu

# Antigen skvamosních buněk (SCC)

- **glykoprotein (MW.42,000D)**
  - kontaminace vzorku kůží nebo potem významně způsobuje falešnou pozitivitu
  - použití u skvamosního karcinomu cervixu (sensitivita 70-85%),
- **small cell lung cancer (SCLC - sensitivity 30-40%),**
- **„head and neck“ nádory (sensitivity 60%)**

# Cytokeratin 19 fragment (CYFRA21-1)

- **Cytokeratiny jsou insolubilní buněčné strukturální proteiny**
  - tyto proteiny jsou fragmentovány během rozpadu buněk
  - cytokeratinové fragmenty jsou rozpustné v séru
- **CYFRA 21-1 (MW 30,000D)**
  - Je vhodný marker u „non-small-cell lung cancer“ (NSCLC) - sensitivita 40-80% v závislosti na stadiu
  - Je vhodným markerem u karcinomu močového měchýře invadujícího do svaloviny měchýře



# Choriongonadotropin (hCG)

- glykoproteinový hormon (MW 46 000D)
  - tvořený nekovalentně vázanými podjednotkami alfa a beta
    - **hCG-specific antibodies are designed against beta chain**
  - syntetizován placentárním syncytiotrofoblastem
  - u germinálních nádorů je syntetizován trofoblastickými strukturami nebo syncytiotrofoblastickými velkými buňkami (buňky seminomu)
  - **hlavní účel je detekce a monitoring gravidity**

# Choriongonadotropin (hCG)

- **U netěhotných žen a mužů jej lze využít k detekci maligního onemocnění**
- **má 100% sensitivitu pro placentární a testikulární choriokarcinomy**
- **má 97% sensitivitu pro hydatiformní molu,**
- **48 - 86% sensitivita pro non-seminal germ cell tumory**

# Prostate-specific antigen (PSA)

- *...jde pravděpodobně o nejlepší nádorový marker používaný v současnosti v klinické*
- glykoprotein (MW 34,000D), produkt prostatické žlázy
- je to serinová proteáza účinkující na liquidifikaci ejakulátu
- je částečně vázán na alfa-1-antichymotrypsin

# Prostate-specific antigen (PSA)

- celkový PSA  $< 2.5$  ng/ml pod 50 let, PSA  $< 5$  nad 50 let
  - důležitý je poměr: free PSA/total PSA (u karcinomu  $< 0,18$ )
- užití pro screening, diagnosu a monitoring karcinomu prostaty
- falešná pozitivita se objevuje u prostatitis a po vyšetření per rectum

# Neuron-specifická enolasa ( NSE)

- Jde o variantu glykolytického enzymu enolasy
- Vyskytuje se v neuroendokrinních tkáních a plicích
- Je to marker volby SCLC (small cell lung cancer), jak v diagnostice, tak monitoringu
- Vhodný i v pediatrické onkologii pro neuroblastom (85%senzitivita), občas je první nález diagnostický
- ***!!! Hemolýza zvyšuje, koncentraci, tj dochází k významné falešné pozitivě.***

# Beta-2-mikroglobulin

- **identický s lehkým řetězcem HLA**
  - **MW 11,800 D**
  - **Jeho nízké koncentrace jsou detegovány ve většině tělesných tekutin**
  - **Je volně filtrován glomerulární membránou a cca z 99,8 % reabsorbován proximálním tubulem**
  - **Fysiologický poločas rozpadu je cca 40 min**
  - **Hraje důležitou roli v aktivaci lymfocytů**

# Beta-2-mikroglobulin

- **používá se pro diagnosu glomerulární a tubulární nefropathie**
  - je ale velmi nestabilní moči
- **...pro určení prognosy nehodgkinských lymfomů a mnohočetného myelomu**

# Tkáňový polypeptidový antigen ( TPA)

## Tkáňový polypeptid-specifický antigen (TPS)

- **TPA je cytokeratinový antigen s MW 22 000 D**
- **tradičně je považovaný za antigen „proliferační“**
- **je vhodným markerem pro tumory plic a měchýře**
- **zvýšené hladiny se však také nacházejí u zánětů a benigního onemocnění plic, jater a urogenitálního traktu**
- **TPS je specifická forma TPA charakterizovaná nepřímo protilátkou anti-M3**



# Důležité webové odkazy

- [www.asco.org](http://www.asco.org)
- [www.nacb.org](http://www.nacb.org)
- <http://egtm.web.med.uni-muenchen.de/index2.html>

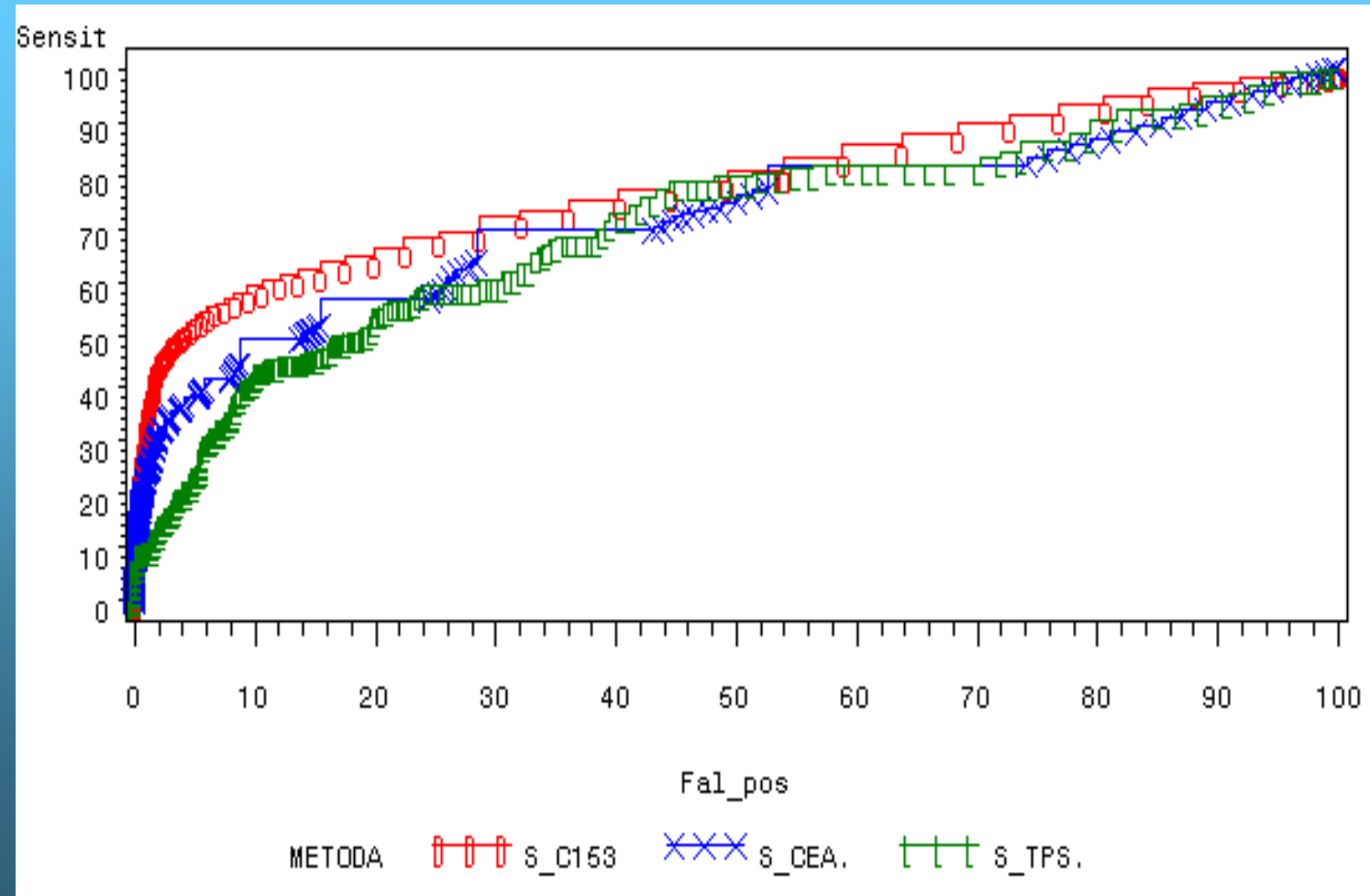
# Klíčové faktory ve stanovování tumorových markerů

- statistické
- biologické
- metodologické

# statistické

- Sensitivita:  $TP/(TP + FN) \times 100$
- Specificita:  $TN/(TN + FP) \times 100$
- PV+ :  $TP/(TP + FP)$
- PV- :  $TN/(TN + FN)$
- ROC analýza

## ROC curves for CA15-3, CEA and TPS in breast cancer



# biologické

- ...vzpomeň na nespecificitu nádorových markerů

*“Benign diseases, menstrual cycle, and the first term of pregnancy give rise to elevated levels of CA 125”*

<b>Disorder</b>	<b>Approximate % of patients with serum CA 125 &gt;35 U/mL*</b>
<b>Endometriosis</b>	24
<b>Benign ovarian tumours</b>	10
<b>Acute salpingitis</b>	40
<b>Chronic salpingitis</b>	8
<b>Uterine myoma</b>	10
<b>Cirrhosis</b>	67
<b>Cirrhosis with ascites</b>	100
<b>Chronic active hepatitis</b>	10
<b>Acute pancreatitis</b>	32
<b>Chronic pancreatitis</b>	2
<b>Renal failure</b>	15

Source: <http://egtm.web.med.uni-muenchen.de/index2.html>

\*Note: Percentages in table may differ from package insert. due to study differences.

*“Non-ovarian malignancies give rise to elevated CA 125 assay values”*

<b>Malignancy</b>	<b>Approximate % of patients with serum CA125 &gt;35 U/mL*</b>
<b>Endometrial</b>	31-33
<b>Cervical</b>	25
<b>Breast</b>	17-20
<b>Colorectal</b>	15
<b>Pancreas</b>	52-58
<b>Lung</b>	29-37
<b>Liver</b>	50-78
<b>Gastric</b>	30
<b>Biliary tract</b>	46

Source: <http://egtm.web.med.uni-muenchen.de/index2.html>

\*Note: Percentages in table may differ from package insert due to study differences.

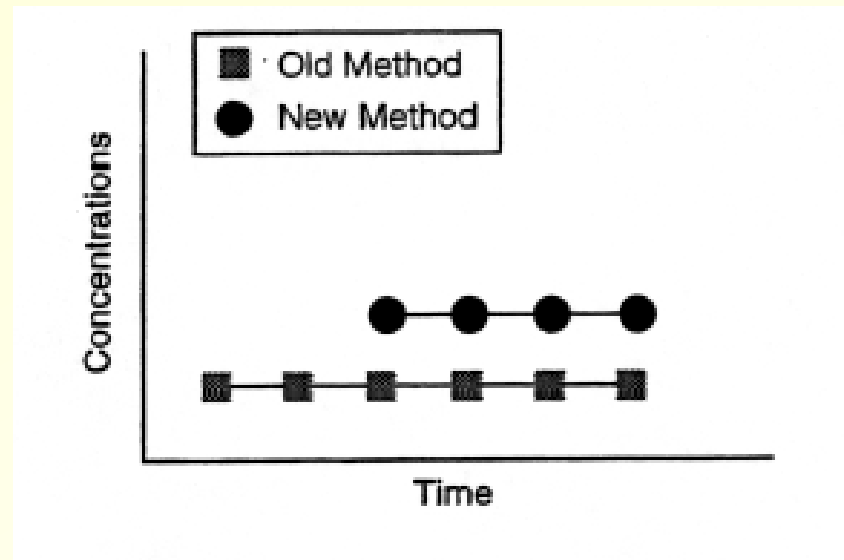
# metodologické

- ...většinou jde o různé zdroje interference



# ...rebaselining specimens

- appropriate time interval over which all specimens should be run **in parallel**.



# *Lidské heterofilní protilátky a anti-mouse protilátky...*

- Heterofilní protilátky:
    - Endogenní, reagující s nehumánními protilátkami (i.e Paul Bunnell – Forsmannův antigen z králičích ledvin)
  - HAMA
    - Human anti-mouse antibody
- způsobují falešně pozitivní nebo negativní výsledky

# Molekulární markery

- „genetická chemopredikce“
- Prediktivní onkologie
- Farmakogenetika
- Detekce minimální residuální choroby (MRD)
  - ...nově termín: „molecular remission“

# ...“nové nádorové markery“

- sérový HER2/neu
  - U pacientek s her2/neu pozitivními tumory
- chromogranin A
  - neuroendokrinní tumory
- Isoenzym pyruvát kinasy, „IPK“
  - seminomy, renální tumory typ Grawitz
- S100/beta
  - maligní melanom

# nové laboratorní technologie

- „array“ technologie
  - DNA/RNA, protein, tissue
- proteomic methods
  - MALDI/TOF, SELDI/TOF, LC/MSMS
- laser-capture microdissection