

NÁDOROVÉ MARKERY A JEJICH VYUŽITÍ V KLINICKÉ PRAXI

IVA MACHOVÁ^a, ANDREA BRÁZDOVÁ^b,
MARTIN FUSEK^b a JARMILA ZÍDKOVÁ^b

^a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.,
Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6 – Dejvice, ^b Ústav
biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-
technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice
iva.machova@vscht.cz

Došlo 8.8.11, přijato 22.8.11.

Klíčová slova: nádorové markery, prostatický specifický
antigen, tkáňový polypeptidový antigen, α -fetoprotein

Obsah

1. Úvod
2. Charakteristika nádorových markerů
 - 2.1. Aplikace v praxi klinické biochemie
 - 2.2. Klasifikace nádorových markerů
 - 2.2.1. Markery produkované nádorem
 - 2.2.2. Markery asociované s nádorem
 - 2.2.3. Detekce mutace genů jako rakovinný marker
3. Závěr

1. Úvod

Rakovina je definována jako soubor onemocnění vycházející z poruch genomu, např. mutace, delece, amplifikace nebo nedostatečné reparace genových defektů. Tyto poruchy vedou k poruchám regulace růstu a množení poškozených buněk. V současnosti nejsou dostupné léčebné postupy, které by tyto poruchy na úrovni DNA cíleně opravovaly. Časně zachycená nádorová onemocnění mohou být úspěšně léčitelná. Důraz je kladen především na včasnou diagnostiku onkologických onemocnění a léčbu s minimálními nežádoucími účinky a náklady. Onkologická onemocnění jsou po nemocech srdce a cév nejčastější příčinou úmrtí v ČR¹. Statistiky ukazují zvyšující se výskyt nádorových onemocnění. Léčba pacienta s nádorovým onemocněním zahrnuje často kombinaci několika postupů (léčba chirurgická, chemoterapeutická, biologická, radioterapeutická, popř. hormonální terapie, imunoterapie, hypertermie, kryoterapie, fotodynamická terapie)². Stanovení hladiny nádorových markerů je nedílnou součástí vyšetřovacích metod pro stanovení diagnózy, prognózy a kontroly průběhu léčby.

Nádorovým markerem rozumíme molekuly převážně bílkovinné povahy, které se nacházejí v organismu

v důsledku maligního zvratu. Lokalizace nádorových markerů je rozmanitá. Mohou být přítomny přímo ve tkáni nádoru (buněčný nádorový marker) nebo jsou nádorem produkovány (s nádorem asociované antigeny), popř. jsou produkovány hostitelem jako odpověď na přítomnost nádoru (indukované nádorové markery – proteiny akutní fáze, např. α -1-antitrypsin, C-reaktivní protein, haptoglobin)^{3,4}. Mezi markery produkované přímo tumory se řadí enzymy (laktátdehydrogenasa), imunoglobuliny a jejich části (tzv. paraproteiny), hormony (choriový gonadotropin, kalcitonin), fragmenty glykoproteinů, onkofetální antigeny (α -1-fetoprotein, karcinoembryonální antigen), fragmenty cytokeratinů (tkáňový polypeptidový specifický antigen, tkáňový polypeptidový antigen), molekuly receptorové povahy (estrogenový a progesteronový typ) a cirkulující buněčné elementy (cirkulující nádorové buňky)⁴. Mezi nejnovější rakovinné markery patří i detekce genových mutací, např. tumor- asociovaných genů.

2. Charakteristika nádorových markerů

Ideální nádorový marker pro klinickou praxi by měl mít stoprocentní specifitu při co nejvyšší senzitivitě, v praxi by se jednalo o jeho „nulovou hladinu“ u lidí bez maligního onemocnění a raný záchyt rakovinného bujení. Jakýkoli orgánově specifický marker by měl korelovat se stádiem a růstem nádoru, prognózou a účinností terapie³. V současnosti zatím není k dispozici univerzální marker, proto se při analýzách stanovuje více rakovinných markerů, jejichž vzájemná specifita a senzitivita se překrývá.

2.1. Aplikace v praxi klinické biochemie

Výhodou biochemické diagnostiky onkologických onemocnění pomocí markerů je relativně nízký práh stanovitelnosti, díky kterému je možno odhalit přítomnost maligního bujení s nádorem již o hmotnosti 1 mg, tedy cca 10^6 rakovinných buněk. Klinická diagnóza je schopná většinou odhalit nádory obsahující cca 10^9 buněk⁴. V současnosti je většina rozpustných nádorových markerů stanovována z krevního séra pacientů. V rámci léčebné terapie se markery využívají pro primární diagnostiku, sledování konkrétního průběhu nemoci a účinnosti terapie. Důležitou úlohu mohou sehrát i ve screeningu onemocnění.

Screening je organizované, kontinuální a vyhodnocované preventivní vyšetření prováděné pro včasný záchyt zhoubných onemocnění u asymptomatických pacientů. Většina markerů vzhledem k nízké specifitě a senzitivitě není vhodná pro preventivní screening velkého počtu asymptomatických pacientů. Ke screeningu se většinou přistupuje u symptomatických pacientů nebo u pacientů s vysokým rizikem vývoje nádorového onemocnění, pře-

devším u genetických predispozic – např. vyšetřování kalcitoninu v rodinách s výskytem medulárního karcinomu štítné žlázy⁴.

Pro stanovení skutečné hodnoty markerů u diagnostikovaného onemocnění a v průběhu léčby je třeba brát ohled na biologické poločasy rozpadu jednotlivých markerů. Je důležité zvolit správné intervaly vyšetření krve tak, aby byl skutečně postihnut účinek terapie, nikoliv jen tzv. lysis fenomén (prudké navýšení hladiny markeru v důsledku cytolyzy způsobené protinádorovou terapií). Z tohoto důvodu se nádorové markery stanovují nejdříve koncem 3. týdne, resp. ve 4. týdnu od zahájení terapie⁴. U stanovení hladin je nutné vyloučit případné rušivé vlivy. Je známo, že některá stanovení jsou ovlivněna postupem vyšetření. Například stanovení prostatického specifického antigenu (PSA), jakožto markeru rakoviny prostaty, je podmíněno odběrem krve až 48 h po rektálním vyšetření prostaty. Závažným bodem vyhodnocení analýzy je možnost falešně pozitivní výsledky způsobené zvýšenou hladinou markerů jako důsledek jejich produkce u nemaligních onemocnění, životosprávou a jinými vlivy nebo poruchou jejich vylučování (zejména u poruchy funkce jater a ledvin)^{3,4}. Hladina markerů se posuzuje v závislosti na klinické remisi a průběhu terapie. Trend stoupající hladiny ve třech po sobě jdoucích odběrech značí recidivu, resp. progresi. Nárůst o více než 25 % značí progresi onemocnění, pokles o více než 50 % značí parciální remisi⁴.

2.2. Klasifikace nádorových markerů

Jak bylo již výše zmíněno, rakovinné markery lze klasifikovat do dvou hlavních skupin: markery produkované nádorem a markery asociované s nádorem.

2.2.1. Markery produkované nádorem

Tato skupina se dále člení na antigeny (onkofetální, onkoplacentární, specifické, proliferativní atd.), hormony, enzymy.

Významným onkofetálním markerem je α -fetoprotein (AFP). AFP je fyziologický glykoprotein produkovaný ve fetálních játrech a žloutkovém vaku v průběhu embryonálního a fetálního období. Jedná se o analog albuminu, jehož hlavní funkcí v organismu je transport řady látek (bilirubin, mastné kyseliny, retinoidy, atd.). Po narození jeho koncentrace klesá. V dospělém zdravém organismu je jeho syntéza minimální, pouze u těhotných žen přechází přes placentu do krve a je tedy fyziologicky zvýšen v těhotenství^{4,5}. Z klinického pohledu je senzitivita AFP vysoká především u hepatocelulárního karcinomu (senzitivita u neléčeného onemocnění je až 80 %), dále pak pro germinální nádory vaječnicků a varlat. U čistě embryonálních nádorů a nádorů žloutkového vaku je dosaženo až 80% senzitivity, u teratomů je to 20 % (cit.⁴⁻⁶).

Do skupiny onkoplacentárních markerů se řadí např. glykoproteinový hormon lidský choriový gonadotropin (hCG). Tento hormon se skládá z α -podjednotky, která je téměř shodná s dalšími hormony (folikuly stimulující a luteinizační hormon) a β -podjednotky, která odpovídá za

biologickou funkci jednotlivých hormonů⁴. Fyziologicky je hCG zvýšen v průběhu těhotenství. V tomto případě tedy nelze hCG spojovat s rakovinnými markery^{7,8}. Metody stanovení hCG jsou založeny na rozpoznání epitopů C-konce β -podjednotky specifickými protilátkami. Citlivost těchto testů je limitována afinitou protilátek k β -hCG. Zvýšená hladina slouží jako ukazatel nádoru varlat, tzv. seminomu. Ve vysokých koncentracích je hCG produkován především trofoblastickými nádory. Zvýšené hodnoty hCG se nalézají u řady jiných nádorů, včetně nádorů vaječnicků, gastrointestinálních, močového měchýře, plic, pankreatu, ledvin. Screening pomocí hCG je doporučován u symptomatických pacientů, např. při podezření na germinální nádory varlat. Stanovení hladiny hCG v séru se používá především pro určení stádia nemoci, potvrzení histologického charakteru nádorů varlat a pro následné monitorování⁴. Zvýšená koncentrace hCG se vyskytuje i u patologických stavů, které nesouvisí s nádorovým onemocněním, např. při výskytu myomů nebo ovariálních cyst⁴.

Prostatický specifický antigen (PSA) zastupuje skupinu specifických markerů. Jedná se o serinovou proteasu štěpící inhibitor motility spermií – semenogelin, převládající protein lidského ejakulátu^{4,5,9}. Fyziologicky dochází k produkci PSA v kolumnárních a kuboidních buňkách prostaty. PSA je mimo to produkován normálními i maligními buňkami mléčné žlázy, avšak jedná se jen o buňky s progesteronovým receptorem⁵. Zvýšená hladina PSA je přednostně spojena s nemocemi souvisejícími s prostatou, tyto nemoci nemusí být rakovinného původu. Často se jedná o benigní hyperplazii prostaty nebo prostatitidu¹⁰. Vzhledem k tomu, že hladina PSA u mužů nad 40 let postupně s věkem vzrůstá, je třeba nastavit detekční limity podle věkových skupin pacientů¹¹. Zvýšené hladiny PSA způsobují i nedávná rektální vyšetření prostaty, ejakulace, biopsie, transuretrální resekce nebo jiná mechanická dráždění prostaty^{4,5}.

Do skupiny proliferativních markerů antigeně specifických řadíme tkáňový polypeptidový antigen (TPA). TPA je jednořetězcový polypeptid tvořený proteolytickými fragmenty cytokeratinu typu střední mikrofilamenty (cytokeratin 8, 18 a 19) (cit.^{4,5,12}). Produkce TPA bývá spojena s rychlou obnovou buněk. Zvýšené hladiny v séru byly pozorovány zejména u pacientů s rakovinou¹³. Využívá se k monitorování progresu karcinomu močového měchýře, nádoru prsu, plic, ledvin a gastrointestinálního traktu^{4,5}. Nicméně i některá onemocnění jater (cirhóza, hepatitida) nebo infekční choroby zvyšují hodnotu TPA (cit.⁴).

2.2.2. Markery asociované s nádorem

Markery sdružované s nádorem jsou zastoupeny určitými proteiny v plazmě a receptory (např. steroidní receptory).

Významným plazmatickým proteinem sloužícím také jako rakovinný marker je ferritin. Tento glykoprotein je fyziologicky produkován retikuloendoteliálními buňkami sleziny, jater a kostní dřeně. Snížená koncentrace bývá průvodním jevem anémie z nedostatku železa^{4,5}. Patologic-

ké zvýšení ferritinu nalezneme u nádorových onemocnění, jako je akutní myeloblastická leukemie, Hodgkinův a neHodgkinův lymfom, mnohočetný myelom. Nespecifické zvýšení pak provází i maligní melanomy a testikulární nádory. Koncentrace tohoto markeru hematologických malignit obvykle koreluje se závažností onemocnění⁴.

Steroidní receptory jsou v současnosti nejvýznamnějším markerem rakoviny prsu⁴. Primárním účelem stanovení molekul estrogenového (ER) a progesteronového (PR) receptoru je odhadnout pravděpodobnou odpověď na endokrinní terapii u pacientů s rakovinou prsu. Jejich stanovení se provádí v současnosti nejvíce imunohistochemicky^{4,6}.

Další významný receptor je z rodiny guanylyl cyklas – guanylyl cyklasa C (GCC), který se fyziologicky nachází jen ve střevní sliznici. Aktivita GCC byla v nedávné době nalezena také u lidí s primárním a metastazujícím karcinomem tlustého střeva, čímž by GCC mohl představovat selektivní marker pro metastázy kolorektálního karcinomu v extraintestinálních tkáních. Selektivní exprese GCC v normální střevní sliznici a v nádorových buňkách tlustého střeva může být využita k rozvoji diagnostických testů pro detekci nádorových buněk v normálních tkáních a v krvi pro stanovení stádia nemoci a pro sledování onemocnění¹⁴.

Dalším markerem nezařazeným do uváděných skupin je např. hemoglobin, jehož průkaz ve stolici je asociován s kolorektálním karcinomem.

2.2.3. Detekce mutace genů jako rakovinný marker

Současný trend v oblasti diagnostiky rakoviny je spojen se studiem mutací na úrovni DNA. Jedná se především o tzv. tumor-asociované geny, které jsou zkoumány imunohistochemickými a molekulárními analýzami (PCR, chipové technologie) jako možné budoucí diagnostické, prognostické a terapeutické markery.

Jeden z nejčastěji mutovaných tumor-supresorových genů u lidských nádorů je gen p53. Mutace genu p53 vede ke vzniku nefunkčního proteinu p53, který tak nemůže kontrolovat genomovou integritu ani indukovat apoptózu, což má za následek množení poškozené buňky a tedy rozvoj rakovinného bujení. U nemalobuněčného typu rakoviny plic se mutace genu p53 nalézají až v polovině nádorů a častěji se vykytuje u nádorů skvamózních buněk než u adenokarcinomu¹⁵. O jeho využití jako rakovinného markeru se uvažuje především ve spojitosti s hodnocením prognózy u rakoviny prsu, plic a tlustého střeva. U rakoviny prsu byla prokázána spojitost mezi výskytem abnormálního p53 a zvýšenou agresivitou nádoru, zvýšeným rizikem recidivy i úmrtí¹⁶.

V patogenezi lidských nádorů hraje důležitou roli také mutace ras genů. Mutací na kodonu 12,13 nebo 61 jednoho ze tří ras genů (K-ras, N-ras, H-ras) dochází ke vzniku aktivního onkogenu. Mutace ras genů se nalézá v různých typech nádorů. Nejvyšší incidence je u adenokarcinomů slinivky břišní, tlustého střeva, plic, nádorů štítné žlázy a u myeloidní leukémie. U jednotlivých druhů nádorů se může vyskytovat s vyšší četností jen jeden určitý mutova-

ný ras gen, např. mutace K-ras genu u adenokarcinomu plic, slinivky a tlustého střeva, oproti tomu N-ras u myeloidní leukémie¹⁷.

V současnosti jsou mutace genů detegovány především pro predikci odpovědi pacienta na některá léčiva, popř. sledování účinnosti terapie (např. gen Her-2 u pacientů s rakovinou prsu) nebo pro odhalení pacientů s vysokým rizikem vzniku rakoviny prsu a vaječníků v rámci screeningu (např. BRCA 1 a 2)^{6,18}.

Genovou nestabilitu vedoucí k tvorbě nádorů způsobuje kromě tumor-supresorových genů i mutace genů zodpovědných za opravu chyb v DNA (tzv. mismatch repair gene – MMR). Nádory s defektním MMR mají odlišné molekulární a klinicko-patologické vlastnosti oproti nádorům s funkčním MMR a obvykle mají i příznivější prognózu. Mutace v těchto genech zabraňuje opravám delecí a insercí vzniklých v mikrosatelitech a vzniká tak tzv. mikrosatelitní nestabilita (MSI), která se vyskytuje až u 90 % hereditárních nepolypózních kolorektálních karcinomů a u 10–15 % sporadických adenomů tlustého střeva. Široce využívaným markerem pro stanovení MSI v nádoru je poly(A)mononukleotidová repetice BAT26 (cit.¹⁹).

3. Závěr

Onkologická onemocnění jsou po nemocech srdce a cév nejčastější příčinou úmrtí v ČR¹. Každý rok je diagnostikována a přijata k léčbě řada nových pacientů s nádorovým onemocněním, v roce 2009 – 55 696 pacientů, v roce 2010 – 55 157 pacientů^{2,20}. Stanovení hladiny nádorových markerů je důležitou součástí vyšetřovacích metod pro včasné zachycení nemoci, stanovení diagnózy a kontroly průběhu léčby. V současnosti není znám marker, jehož specifita a senzitivita by byla natolik vysoká, aby mohl být použit jako tzv. univerzální standard. Nicméně je známa řada specifických markerů, jejichž souběžné stanovení je dostatečně senzitivní pro záchyt velkého procenta onkologických onemocnění. Efektivní využití celé řady nádorových markerů v klinické praxi vyžaduje spolupráci praktických lékařů, onkologů, chirurgů a dalších specialistů. Důkladný popis, správná interpretace a odhalení či vyvarování se falešné pozitivitě výsledků u některých fyziologických nebo i patologických stavů nesouvisejících s rakovinou by mohlo přispět ke spolehlivému screeningu a volbě účinné terapie.

Tato práce byla financována z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT (Rozhodnutí č. 21/2011), IAA 600110902 a podpořena grantovým projektem VZ MSMT 320519126.

LITERATURA

- Holík J.: Manuál prevence a časné detekce nádorových onemocnění "Prevence nádorů v rukou praktických lékařů". Masarykův onkologický ústav, Brno 2002.

2. Srb T.: Aktuální informace Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky č.35/2010 “Činnost radiační a klinické onkologie v České republice v roce 2009“, ÚZIS ČR, 2010.
3. Nekulová M., Šimíčková M., Valík D.: Klin. Biochem. Metab. 14, 152 (2006).
4. Dubská L., Nekulová M., Valík D., Zima T., Springer D., Malbohan I., Topolčan O.: *Doporučení České společnosti klinické biochemie (ČSKB ČLS JEP), České onkologické společnosti (ČOS ČLS JEP), České společnosti nukleární medicíny (ČSNM ČLS JEP) - sekce imunoanalytických metod k využití nádorových markerů v klinické praxi*, str. 1–26. http://www.cskb.cz/res/file/doporuzeni/TM/TM_dopor.pdf, staženo 9. července 2011.
5. https://www.zdravcentra.cz/index.php?act=k-10&did=1035&page=kapitoly/specialni_cast/nadorove_onemocneni/10_5.htm, staženo 22. října 2010.
6. Sturgeon C. M., Duffy M. J., Stenman U., Lilja H., Brünner N., Chan D. W., Babaian R., Bast R. C., Dowell B., Esteva F. J., Haglund C., Harbeck N., Hayes D. F., Holten-Andersen M., Klee G. G., Lamerz R., Looijenga L. H., Molina R., Nielsen H. J., Rittenhouse H., Semjonow A., Shih I., Sibley P., Söletormos G., Stephan C., Sokoll L., Hoffman B. R., Diamandis E. P.: Clin. Chem. 54, 11 (2008).
7. Stenman U. H., Alfthan H.: v knize *Tumor Markers Physiology, Pathobiology, Technology, and Clinical Applications* (Diamandis E. P., Fritsche H. A., Lilja H., Chan D. W., Schwartz M. K., ed.) část II., kap. 29. AACC Press, Washington 2002.
8. Cole L. A., Rinne K. M., Shahabi S., Omrani A.: Clin. Chem. 45, 313 (1999).
9. Robert M., Gibbs B., Jacobson E., Cagnon C.: Biochemistry 36, 3811 (1997).
10. Stamey T. A., Caldwell M., McNeal J. E., Nolley R., Hemenez M., Downs J.: J. Urol. 172, 1297 (2004).
11. Oesterling J. E., Jacobsen S. J., Chute C. G., Guess H. A., Girman C. J., Panser L. A., Liber M. M.: J. Am. Med. Assoc. 70, 860 (1993).
12. Fazal H., Hamed H., Hassan A., Khursheed H., Aneela N. H., Borowsky M.: *Gynecologic tumor markers*. <http://emedicine.medscape.com/article/269839-overview>, staženo 5. října 2010.
13. Tuxen M. K., Soletormos G., Dombernowsky P.: Cancer Treat. Rev. 21, 215 (1995).
14. Carrithers S. L., Barber M. T., Biswas S., Parkinson S. J., Park P. K., Goldstein S. D., Waldman S. A.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 14827 (1996).
15. Porebska I., Wyrodek E., Kosacka M., Adamiak J., Jankowska R., Harłodzińska-Szmyrka A.: In Vivo 20, 599 (2006).
16. Elledge R. M., Allred D. C.: Breast Cancer Res. Treat. 52, 79 (1998).
17. Bos J. L.: Cancer Res. 49, 4682 (1989).
18. Esteva F. J., Cheli C. D., Fritsche H., Fornier M., Slamon D., Thiel R. P.: Breast Cancer Res. 7, 436 (2005).
19. Brennetot C., Buhard O., Jourdan F., Flejou J.□F., Duval A., Hamelin R.: Int. J. Cancer 113, 446 (2005).
20. Srb T.: Aktuální informace Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky č.27/2011 “Činnost radiační a klinické onkologie v České republice v roce 2010“, ÚZIS ČR, 2011.

I. Machová^a, A. Brázdová^b, M. Fusek^b, and J. Zídková^b (^a*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*, ^b*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Tumor Markers and Their Use in Clinical Practice**

Tumor markers known also as cancer or oncological markers are substances produced either by tumor or normal cells as a response to the presence of cancer. The markers are used for the detection, diagnosis, prognosis and control of treatment. There is no absolutely specific or universal cancer marker; therefore different markers for different cancer types are used in clinical practice. A problematic feature of cancer markers is their falsely positive results under physiological and non-cancer conditions.