

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Tumorové markery karcinomu prsu

Bakalářská práce

Vedoucí práce: PharmDr. Miloslava Netopilová, PhD.

Hradec Králové, 2009

Eva Krchňáková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

15.5.2009

Touto cestou bych chtěla poděkovat paní Miloslavě Kapustové, vrchní laborantce oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Olomouc za poskytnutí odborných materiálů pro problematiku karcinomu prsu. Dále bych chtěla poděkovat PharmDr. Miloslavě Netopilové, PhD. za pomoc a trpělivost při realizaci práce.

Obsah

1 Úvod.....	6
2 Morfologie mléčné žlázy	7
2.1 Anatomie mléčné žlázy	7
2.2 Histologie mléčné žlázy	8
2.3 Vývoj mléčné žlázy v závislosti na hormonech	8
3 Patologie mléčné žlázy	9
3.1 Druhy nádorů prsu.....	9
3.1.1 Karcinom in situ.....	9
3.1.2 Invazivní formy karcinomu.....	10
3.1.3 Metastatický proces u karcinomu prsu.....	11
3.2 Incidence karcinomu prsu.....	11
3.3 Etiologie a patogeneze.....	12
3.4 Rizikové faktory	13
3.5 Klinické příznaky	14
4 Tumorové markéry	15
4.1 Definice a vlastnosti tumorového markeru.....	15
4.1.1 Vysoká specifičnost	15
4.1.2 Vysoká citlivost.....	15
4.1.3 Korelace mezi výší laboratorního parametru a velikostí nádoru	16
4.2 Oblasti užití tumorových markerů.....	16
4.2.1 Screening zhoubných nádorů	16
4.2.2 Diagnostika zhoubného nádoru.....	16
4.2.3 Určení stadia nádoru a jeho prognózy.....	16
4.2.4 Sledování průběhu choroby a efektu terapie	17
4.3 Vyšetřovaný materiál.....	17
4.4 Metody pro stanovení tumorových markerů a jejich principy	18

4.4.1 Radioimunoanalýza (RIA) a imunoradiometrická analýza (IRMA).....	19
4.4.2 Enzymová imunoanalýza (EIA).....	20
4.4.3 Imunofluorescenční analýza.....	21
4.4.4 Chemiluminiscence	22
4.5 Přehled soudobých tumorových markerů karcinomu prsu.....	23
4.5.1 Karcinoembryonální antigen (CEA)	23
4.5.2 Nádorový antigen CA 15-3	25
4.5.3 Nádorový antigen CA 549	26
4.5.4 Antigen mucinózních karcinomů (MCA)	27
4.5.5 Nádorový antigen CA 125	27
4.5.6 Cytokeratiny	29
4.5.7 Beta2 - mikroglobulin	31
4.5.8 Feritin	32
4.5.9 Hormonální receptory	32
4.6 Nejnovější tumorové markery objevené pro diagnostiku rakoviny prsu.....	35
4.6.1 Receptor pro epidermální růstový faktor (HER-2/neu)	35
4.6.2 Urokináza (u-PA) a inhibitor aktivátorů plazminogenu (PAI-1)	37
5 Závěr	39
6 Seznam zkratk	42
7 Seznam literatury	45

1 Úvod

Téma bakalářské práce jsem si vybrala, protože mě problematika diagnostiky rakoviny vždy velmi fascinovala a zajímala. Nechtěla jsem práci zaměřit na obecný popis všech stanovovaných markerů, ale chtěla jsem se věnovat markerům jednoho orgánu. Vybrala jsem si mléčnou žlázu, protože rakovina mléčné žlázy je stále nejzávažnějším onemocněním ženské populace. Prevence a včasná diagnóza rakoviny je to nejdůležitější. Proto se zaměřuji na tumorové markery, které by měly pomoci k odhalení nádoru.

Téma rakoviny prsu je velice rozsáhlé, a proto bych se ráda zaměřila na určité části související s onemocněním tohoto orgánu. V první kapitole bych se ráda věnovala morfologickému popisu samotného prsu. Kapitola bych rozdělila na část anatomickou, histologickou a na část zaměřenou na vývoj prsu v závislosti na hormonech.

Druhou kapitolu by měla tvořit patologie prsu, zahrnující jednotlivé druhy nádorů mléčné žlázy. Kapitola by měla dále zahrnovat incidenci onemocnění, etiologii a patogenezi, rizikové faktory a v neposlední řadě také klinické příznaky.

Třetí kapitola se bude zabývat problematikou tumorových markerů. Jednotlivé části budou popisovat obecné vlastnosti markerů, vyšetřovaný materiál pro stanovení markerů a také metody stanovení markerů. Další dvě podkapitoly se budou věnovat samostatnému popisu tumorových markerů hlavních, vedlejších a také popisu tumorových markerů nově používaných.

Hlavním cílem mé práce je vytvořit souhrn hlavních a doplňkových humorálních tumorových markerů používaných pro diagnostiku rakoviny prsu, stručně charakterizovat buněčné tumorové markery a uvést markery nově používané.

2 Morfologie mléčné žlázy

2.1 Anatomie mléčné žlázy

Glandula mammae (mléčná žláza) je největší apokrinní kožní žláza, která podmiňuje vyvýšení zvané mamma (prs). V plném vývoji mamma sahá vertikálně od 3. do 6. žebra a horizontálně od parasternální čáry do přední čáry axilární. Průměrný horizontální rozměr je 12 cm a vertikální 11 cm. Rozměry závisí na podnebí (teplotě) a na věku, přičemž velikost prsu není vždy proporční k velikosti vlastní žlázy (Čihák, 1997).

Kůže prsu je světlá a tenká, takže prosvítají podkožní žíly. Je bohatě inervovaná. Na vrcholku prsu je areola mammae (dvorec) o průměru 3-5 cm, který se v graviditě zvětšuje. Dvorec je pigmentovaný (růžový u světlovlasých typů, postupně hnědý až temně hnědý s přibývajícím celkovou pigmentací ženy). Zvýšenou pigmentaci lze pozorovat i v těhotenství. Ve dvorci (spíše při jeho obvodu) jsou drobné hrbolky, které jsou vyzdviženy glandulae areolares (žlázkami) stavebně shodnými s mléčnou žlázou (Čihák, 1997).

Papilla mammae (prsí bradavka) se nachází uprostřed areoly. Zpravidla je papilla mírně vyvýšená; někdy lehce vkleslá. Na hrotu papily ústí ductus lactiferi (mlékovody) přicházející z hloubky žlázy. Area cribriformis papillae je tvořena 15-20 otvůrkami ústícími na vrcholku papily. Papila má mazové žlázy, které svým sekretem chrání kůži před macerací mlékem a slinami kojence (Čihák, 1997).

Corpus mammae (těleso žlázy) tvoří vlastní žláza, uložená uvnitř prsu. Corpus mammae tvoří laločnaté, bělošedé a (mimo graviditu) tuhé těleso s nerovným povrchem. Těleso není okrouhlé a zevně vybíhá v malý processus axillaris. V době mimo graviditu váží žlázové těleso 130 až 200 g, v období laktace 300 až 500 g (někdy až 900 g) (Čihák, 1977).

Žlázové těleso tvoří lobi mammae (laloky mléčné žlázy), které se dále člení na lobuli mammae (lalůčky mléčné žlázy) složené ze žlázových alveolů. Ductus lactiferi (mléčné vývody z lalůček) se spojují v jeden ductus lactifer pocházející vždy z jednoho laloku žlázy. V době gravidity se zvětšují mléčné vývody (změny začínají od konce 2. měsíce těhotenství) a v době laktace se na nich objevují sinus lactiferi (rozšířená místa), kde se hromadí mléko před odchodem z papily. Sinusy jsou široké 4 až 9 mm. Mléčnou

žlázu v prsu obaluje tukový polštář, který tvoří vrstvu premammární a vrstvu retromammární (Čihák, 1997).

2.2 Histologie mléčné žlázy

Glandula mammae se skládá z 15-20 složených tuboalveolárních žláz. Každá žláza tvoří samostatný lalok (lobus). Jednotlivé laloky jsou odděleny hustým kolagenním vazivem a tukovou tkání. Osu každého laloku tvoří lobární vývod – ductus lactiferus s dvouvrstevným kubickým nebo cylindrickým epitelem. Bazální buňky jsou těsně vedle sebe uspořádané myoepitelové buňky. Před vyústěním na bradavce je ductus lactiferus lemován vícevrstevným dlaždicovým epitelem. Ductus lactiferus se větví v interlobulární vývody, které jsou lemovány jednovrstevným kubickým epitelem. Epitelové buňky jsou uloženy na dobře vyvinuté bazální lamině a jsou obklopeny diskontinuální vrstvičkou myoepitelových buněk (Konrádová et al., 2000).

2.3 Vývoj mléčné žlázy v závislosti na hormonech

Diferenciace a funkce mléčné žlázy jsou regulovány souhrou řady hormonů. Proces zahajují ženské pohlavní hormony. Estrogeny vyvolávají růst vývodů a gestageny proliferaci alveolů. Jistý růst žlázové tkáně nastává v pubertě a současně se v tomto období v prsech ukládá tuková tkáň. Rozsáhlý vývoj však nastává v těhotenství, když na tkáň působí vysoké koncentrace estradiolu a progesteronu. Pro úplnou diferenciaci je zapotřebí dalších účinků hormonů: prolaktinu, glukokortikoidů, insulinu a růstového hormonu. Pouze koncentrace prolaktinu ze všech těchto hormonů se v graviditě výrazně změní. V pozdní graviditě se zvyšuje z méně než 20 ng/l na více než 2000 ng/l (Murray et al., 1998).

Progesteron, nezbytný pro diferenciaci alveolů, potlačuje v pozdním těhotenství tvorbu a sekreci mléka. Laktace začne, až když hladina progesteronu po porodu prudce klesne. Hladiny prolaktinu sice po porodu také rychle klesají, ale jsou stimulovány každým kojením, čímž se zajišťuje trvalá laktace. Když žena nekojí, laktace postupně ustává. Laktaci lze rychle ukončit podáním velké parenterální dávky androgenu před tím, než žena začne kojit. Kojením se též stimuluje uvolnění oxytocinu z neurohypofýzy. Oxytocin stimuluje kontrakce myoepithelových buněk obklopujících alveolární vývody, a tím vytlačuje mléko ze žlázy (Murray et al., 1998).

3 Patologie mléčné žlázy

3.1 Druhy nádorů prsu

Nádory prsu vznikají v anatomických strukturách mléčné žlázy, které tvoří žlázové těleso prsu, fibrózní a tuková tkáň. Z epitelu mléčné žlázy vzniká převážná většina skutečných nádorů prsní žlázy, které mohou mít benigní povahu (papilomy, fibroadenomy). Vzácně mohou benigní nádory vznikat také z mezenchymových struktur (lipomy). Z maligních nádorů jsou nejčastější karcinomy (Klener, 2002).

Karcinom prsu vzniká nejčastěji z terminálních lalůček (lobulární) prsní žlázy a z jejich vývodů (duktální). Vzniku karcinomu zpravidla předchází atypická duktální nebo lobulární hyperplazie, z níž se v první fázi vyvine neinvazivní forma karcinomu, označované jako karcinom in situ (Klener, 2002).

3.1.1 Karcinom in situ

1.) Duktální karcinom in situ (DCIS)

Duktální karcinom in situ vzniká proliferací transformovaných epitelových buněk duktálního systému a neproniká bazální membránou do periduktálního stromatu (Klener, 2002). Nádorový epitel je atypický s nápadnými jádérky a polymorfními jádry (Mačák, 2004). Karcinom se vyskytuje v různých histologických variantách. Je častější u žen po menopauze, častá je recidiva. Zvláštní formou duktálního karcinomu in situ je Pagetův karcinom bradavky (Klener, 2002). Typickým znakem pro tento karcinom je přítomnost nádorových buněk či jejich skupin v dlaždicovém epitelu bradavky. Není to samostatný typ, ale způsob šíření karcinomu, který postihuje mlékovody. Pagetův karcinom se klinicky jeví jako zvětšení a rozbrázdění povrchu bradavky (Povýšil et al., 2004). Pokud je neléčen chová se jako infiltrativní karcinom (Koutecký et al., 1989).

2.) Lobulární karcinom in situ (LCIS)

Lobulární karcinom vychází z epitelových buněk mamárních lobulů. Karcinom je charakterizován proliferací uniformních malých buněk v četných lalůčcích působící jejich dilataci. Na rozdíl od DCIS není detekovatelný mamograficky (Klener, 2002). U karcinomu byl zjištěn dvojitý typ buněk: typ A je tvořen diploidními buňkami s uniformními jádry bez atypií a bez jadérek. Typ B obsahuje hyperdiploidní buňky

s většími jádry, výraznější polymorfií a jádérky (Mačák, 2004). Je častější u žen před menopauzou (Klener, 2002).

3.1.2 Invazivní formy karcinomu

1.) Infiltrující duktální karcinom

Infiltrující duktální karcinom je nejčastějším typem karcinomu prsu (kolem 75 %) (Klener, 2002). Karcinom má většinou velikost 1-2 cm, bývá fixován k okolním strukturám nebo i k hrudní stěně (Mačák, 2004). Duktální karcinom tvoří často tubulární uspořádání, je provázen reaktivní fibrózou, která je odpovědná za téměř kamennou tuhost nádorového útvaru při palpačním vyšetření (skirhotická forma). Metastazuje do kostí, jater a plic (Klener, 2002).

K méně častým formám duktálních invazivních karcinomů patří tyto typy:

Tubulární karcinom tvoří asi 5 % karcinomů prsu a má zpravidla lepší prognózu.

Medulární karcinom tvoří 5-7 % karcinomů prsu. Postihuje častěji mladší ženy, charakteristická je masivní lymfocytární infiltrace (Klener, 2002) a měkká konzistence. Nádorové buňky vytvářejí ložiska tvořená velkými buňkami (Mačák, 2004).

Mucinózní (koloidní) karcinom tvoří 3 % karcinomů prsu. Karcinom je charakterizován akumulací extracelulárního mucinu. Roste pomalu a může dosahovat značných rozměrů (Klener, 2002).

Papilární karcinom tvoří 1-2 % nádorů. Karcinom bývá nádorem starších žen. Nádor má relativně dobrou prognózu (Klener, 2002).

Komedonový karcinom nádor s vysokým maligním potenciálem. Cytologicky je nehomogenní, prognosticky závažnější (Klener, 2002).

Inflamatorní (erysipeloidní) karcinom vyskytující se v 1-3 %. Inflamatorní karcinom je nejagresivnější formou karcinomu prsu (Klener, 2002) s častým a rychlým šířením do kožních lymfatických uzlin (Koutecký et al., 1989). Inflamatorní karcinom je charakterizován infiltrací celého prsu, vyskytuje se erytém, edém kůže, která má charakteristický vzhled pomerančové kůry (peau d'orange). Inflamatorní karcinom se vyznačuje rychlým růstem a časným metastazováním. Metastatické postižení uzlin se vyskytuje ve více než 90 %. Téměř u poloviny nemocných se vyvine i v druhém prsu. Histologicky jde o špatně diferencované duktální karcinomy (Klener, 2002).

2.) Infiltrující lobulární karcinom

Infiltrující lobulární karcinom tvoří asi 10 % ze všech karcinomů prsu. Vzniká často v zevním horním kvadrantu, v 30 % případů je bilaterální (Klener, 2002). Je obtížné rozpoznat primární ložisko od metastázy. Šíří se do vzdálených míst, např. ovaria, dělohy, kostní dřeně a do mozku (Mačák, 2004). Kromě klasické formy se vyskytuje ještě v tubulárně alveolární variantě (Klener, 2002).

3.1.3 Metastatický proces u karcinomu prsu

Karcinom prsu se kromě lokálního invazivního růstu šíří jednak lymfatickou, jednak hematogenní cestou. Lymfatické metastázy jsou nejčastěji v regionálních mízních uzlinách. Postižení nadklíčkových a podklíčkových uzlin se již považuje za vzdálené metastázy. Hematogenní šíření do kostí, plic, pleury, jater, ovaria, kůže a mozku může nastat dokonce již u subklinického nádoru. Proto se na karcinom prsu pohlíží jako na systémové onemocnění od samého počátku (Klener, 2002).

3.2 Incidence karcinomu prsu

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem žen, představuje víc než 30% všech ženských nádorů (Klener, 2002). V roce 1977 bylo u nás hlášeno 2 751 ZN prsu (tj. 52,4 onemocnění na 100 000 žen). V roce 2002 bylo v České republice hlášeno 5 224 nových onemocnění ZN prsu, tj. o 89,9 % více (v přepočtu na 100 000 žen to bylo 99,8). Srovná-li se výskyt podle věkových skupin (rok 2002), první hlášená nová onemocnění na diagnózu rakoviny prsu u žen jsou ve věkové skupině 20 - 24 let (2 hlášená nová onemocnění, tj. 0,5 na 100 000 žen příslušné věkové skupiny), potom dochází k postupnému vzestupu, s nejvyšším absolutním počtem ve věkové skupině 55 - 59 let (720 hlášených nových ZN prsu, tj. 198,3 na 100 000 žen příslušné věkové skupiny), v přepočtu na 100 000 žen byl nejvyšší počet hlášených nových onemocnění ve věkové skupině 85 a více let (324,9). Počet hlášených nových onemocnění ZN prsu výrazně vzrůstá, ale úmrtnost od roku 1990 (s výjimkou roku 1995) zůstává prakticky nezměněna. V roce 2001 zemřelo na toto onemocnění 1 893 žen (tj. 36,1 na 100 000 žen) a v roce 2002 to bylo 1965 žen, tj. 37,5 na 100 000 žen. Poměr incidence na 100 000 žen na ZN prsu a mortality na ZN prsu roste, což je pozitivní jev, v roce 1970 činil 1,6 a v roce 2001 a 2002 to bylo 2,7. Tyto výsledky lze přičítat včasnému zachytu onemocnění díky vyšší informovanosti veřejnosti (samo-vyšetřování prsu, různé

vzdělávací akce pro veřejnost), preventivním kontrolám u lékaře, screeningu, mamografickým i sonografickým vyšetřením a úspěšné léčbě (Ajmová, 2004).

Karcinom prsu u mužů se vyskytuje vzácně (poměr výskytu karcinomu u mužů a u žen je 1:135). Představuje asi 0,17 % ze všech zhoubných nádorů mužské populace. Karcinom prsu u mužů je častější po 50. roce věku a u jedinců s Klinefelterovým syndromem. Významná role v onemocnění se přisuzuje estrogenům, jejich zvýšenou koncentrací (např. při poruše jaterních funkcí nebo při užívání estrogenů pro karcinom prostaty) lze vysvětlit popisovanou vyšší incidencí karcinomu u mužů s gynekomastií a u nemocných léčených estrogeny (Klener, 2002). Karcinom brzy prorůstá do kůže či hrudní stěny, což zhoršuje prognózu (Povýšil et al., 2004).

3.3 Etiologie a patogeneze

Karcinom prsu patří mezi tzv. hormonálně závislé nádory. Kancerogenní účinky se přisuzují zejména estrogenům. Estrogeny indukují zvýšenou expresi některých růstových faktorů a patrně i onkogenů, jejichž produkty významným způsobem ovlivňují proliferační aktivitu buněk. Za fyziologických okolností jsou však tyto účinky v rovnováze s různými antiproliferačními působky, jako je např. transformační růstový faktor beta (TGF- β). Rovnováhu může porušit trvajících estrogení stimulace nebo účinky dalších kancerogenních faktorů působících různé genetické abnormality. V některých genech vznikají během života i spontánní mutace, které za fyziologických okolností umí buňka opravit. Pokud se tak stane (např. při poruše opravených genů), je důsledkem genetických abnormalit aktivace některých onkogenů (myc, ras, Her-2) nebo alterace recesivních onkogenů (p53, Rb). To se projeví postupnou změnou fenotypu buněk, která dospěje přes dysplastické změny, atypické dysplastické změny, karcinom in situ až ke vzniku invazivního karcinomu (Klener, 2002).

V patogenezi karcinomu prsu se uplatní rovněž aktivita stimulovaných stromálních buněk, produkujících proteolytické enzymy a angiogenní faktory usnadňující růst nádoru a metastazování. Vývoj karcinomu prsu je podobně jako vznik jiných zhoubných nádorů dlouhodobý vícestupňový proces. Od maligní transformace buňky do vzniku klinicky zjevného nádoru může uběhnout relativně dlouhá doba, neboť nádor o průměru 1 cm obsahuje již 10^9 nádorových buněk. Tato populace je výsledkem asi 30 zdvojení. Při zdvojovacím čase, který činí u karcinomu prsu 20-300 dní, je zřejmé, že od první

nádorové mitózy mohlo uplynout 2-17 roků. Popsané mechanismy se uplatňují u převážné většiny tzv. sporadických forem karcinomu prsu, to je u 75-85 % nemocných (Klener, 2002).

U 10-15 % pacientů vzniká karcinom prsu na podkladě dědičných genetických změn. Hereditární formy karcinomu prsu jsou podmíněny mutací genů rakoviny prsu, včasného nástupu (BRCA-1) nebo (BRCA-2), která se dědí autozomálně dominantně. Riziko onemocnění nádorem prsu je u přenašeček mutovaného genu značně vysoké, u žen židovského etnika až 80 %. Přenašeči muži jsou naopak ohroženi více vznikem karcinomu prostaty nebo kolorekta. Hereditární karcinom prsu se vyskytuje často bilaterálně a vzniká většinou u žen mladších 35 let (Klener, 2002).

3.4 Rizikové faktory

Rizikové faktory byly studovány na velmi početných souborech nemocných. Kromě již zmíněných genetických abnormalit mezi ně patří především délka expozice estrogenům, tj. časná menarche, pozdní menopauza a nuliparita. Ženy, u kterých proběhla menopauza po 55. roce věku, mají dvojnásobně vyšší riziko rozvoje karcinomu prsu než ženy s menopauzou před 45. rokem věku. Naopak gravidita nebo nepravidelnosti v menstruačním cyklu riziko vzniku karcinomu prsu snižují. Zajímavé je zjištění, že pozdní věk prvního porodu (po 35. roce) představuje vyšší riziko než nuliparita. Ženy s epitelovou hyperplazií a buněčnými atypii mají až 5krát vyšší riziko vzniku karcinomu. Mezi další rizikové faktory patří ionizující záření, obezita, zejména ve vyšším věku, zvýšený příjem tuků a nedostatek fyzické aktivity. Naproti tomu vliv kouření, alkoholu, vliv chemických kancerogenů (polychlorované bifenyly, pesticidy) nebo vliv užívání kontraceptiv ve vztahu k výskytu karcinomu prsu nebyl jednoznačně doložen (Klener, 2002).

3.5 Klinické příznaky

V počátečních stádiích růstu nevyvolává karcinom prsu žádné příznaky. Nádor větších rozměrů se projeví jako hmatná bulka, většinou nebolestivá. Někdy může na přítomnost nádoru v prsu upozornit též změna konfigurace prsu, jeho zvětšení, jindy naopak jeho zmenšení, popřípadě zvýraznění žilní pleteně. Mohou být přítomny povrchové změny na bradavce (šupinatění nebo eroze), vtahování kůže (důlkovatění). Oploštění bradavky nebo její vpáčení stejně jako krvavý výtok jsou zpravidla již projevem pokročilého onemocnění. U metastatické formy onemocnění pozorujeme bolesti v kostech a hyperkalcemický syndrom. Kromě úbytku hmotnosti, nechutenství může být karcinom prsu provázen i dalšími paraneoplastickými příznaky (neuromuskulární syndrom) (Klener, 2002).

4 Tumorové markéry

4.1 Definice a vlastnosti tumorového markeru

Laboratorní ukazatele přítomnosti zhoubného novotvaru se obvykle nazývají tumorové markery. Jsou to molekuly převážně proteinového charakteru, které jsou přítomny v organismu v důsledku vzniku a vývoje maligního procesu. Markery se mohou vyskytovat v nádorových buňkách nebo na jejich povrchu, které se označují jako celulární tumorové markery. Daleko častěji se však prokazují v séru či jiných tělesných tekutinách, to jsou humorální tumorové markery. Tumorové markery mohou být produkovány přímo nádorovými buňkami (s nádorem asociované antigeny) nebo jinými tkáněmi jako jejich odpověď na maligní proces v organismu (indukované nádorové markery). Ideální tumorový marker by měl splňovat několik kritérií, aby byl klinicky co nejlépe využitelný (Nekulová, 2006).

4.1.1 Vysoká specifita

Pozitivní hodnota tumorového markeru by měla cíleně vypovídat o postižení konkrétního orgánu. Tento předpoklad však není často splněn. Pacienti bez zhoubného nádoru by měli poskytovat negativní výsledek testu. Tento předpoklad zdaleka neplatí pro většinu tumorových markerů. Laboratorní ukazatel pak dává pozitivní (patologický) výsledek u řady nenádorových onemocnění, zejména zánětlivých. Většina nezhoubných příčin vyvolává jen mírné či střední zvýšení koncentrace tumorového markeru. Existují samozřejmě také laboratorní testy, které jsou pozitivní u maligních nádorů, avšak zcela nespecificky jako následek zánětlivé reakce organismu (Nekulová, 2006).

4.1.2 Vysoká citlivost

Jedná se o schopnost laboratorního ukazatele prokázat přítomnost zhoubného nádoru v počátečním stádiu. Množství tumorových markerů nespĺňuje ani tento předpoklad a v dostatečně vysokém procentu jsou pozitivní až u velkých a zejména generalizovaných tumorů. Z toho důvodu se jen výjimečně hodí pro včasný záchyt zhoubných novotvarů. Citlivost a specifita každého testu spolu neoddelitelně souvisí; jejich poměr navíc závisí na hodnotě, považované za hraniční pro hodnocení výsledku testu, tzv. cut off value, diskriminační hodnota. Citlivost může být zvýšena při kombinaci několika tumorových markerů, avšak obvykle za cenu nižší specifity (většího počtu falešně pozitivních výsledků) (Nekulová, 2006).

4.1.3 Korelace mezi výší laboratorního parametru a velikostí nádoru

Koncentrace tumorového markeru závisí nejen na rozsahu nádoru, množství nádorových buněk (staging), ale i na stupni zralosti jeho buněk (grading), dále na jejich schopnosti produkovat příslušný marker a vyplavovat ho do krve. To je dáno např. stupněm prokrvení nádoru. Výše testu závisí i na faktorech, které nemají s nádorem nic společného, tak např. pokles glomerulární filtrace způsobí retenci nízkomolekulárních markerů, které normálně procházejí glomerulem. Dojde-li k tomu např. v průběhu cytostatické léčby, může nárůst ukazovatele mylně simulovat progresi nádoru (Nekulová, 2006).

4.2 Oblasti užití tumorových markerů

4.2.1 Screening zhoubných nádorů

K vyhledávání zhoubných novotvarů u asymptomatických jedinců se tumorové markéry nehodí pro relativně nízkou citlivost a nedostatečnou specifickou, a to jak vzhledem k přítomnosti maligního onemocnění, tak i k postižení určitého orgánu. Naproti tomu mohou být užitečné při vyšetřování rizikových skupin jedinců, ohrožených konkrétním nádorem (Nekulová, 2006).

4.2.2 Diagnostika zhoubného nádoru

Z podobných příčin nejsou tumorové markéry obvykle vhodné ani pro primární diagnostiku. Výjimku tvoří např. pozitivní nález alfa-fetoprotein (AFP), který potvrzuje podezření na primární karcinom jater či teratom, nebo enoláza specifická pro neurony (NSE) u podezření na malobuněčnou rakovinu plic (Nekulová, 2006).

4.2.3 Určení stadia nádoru a jeho prognózy

Vysoké hodnoty tumorového markeru obvykle znamenají pokročilé onemocnění. Z hlediska stanovení prognózy znamenají tumorové markéry další faktor, nezávislý na ostatních obvyklých ukazatelích prognózy. Hladina karcinoembryonálního antigenu (CEA) má určitou prognostickou výpověď u kolorektálního karcinomu, AFP a choriogonadotropin (hCG) u germinativních tumorů, β_2 -mikroglobulin u mnohočetného myelomu. Je nutné si uvědomit, že výška hladiny tumorového markeru nezávisí jen na velikosti nádoru, ale i na řadě jiných faktorů, které nemají s prognózou nic společného (Nekulová, 2006).

4.2.4 Sledování průběhu choroby a efektu terapie

Tyto oblasti jsou pro uplatnění tumorových markerů nejdůležitější. Vždy je nutné stanovit hladinu tumorového markeru před léčbou (chirurgickou, radio- či chemoterapií). Negativizace hladin odráží úspěch léčby, je však zapotřebí vždy vzít v úvahu biologický poločas, který se u jednotlivých markerů pohybuje v širokém rozmezí od hodin (hCG, β_2 -mikroglobulin) až po dny (AFP, CA 15-3, CEA aj.). Vzestup koncentrace tumorového markeru bezprostředně po léčbě může být známkou rozpadu nádorových buněk vlivem účinné terapie (tzv. lysis fenomen). Z uvedených důvodů se kontrolní odběr provádí obvykle až za 3-4 týdny po zahájení léčby. Nárůst koncentrace tumorového markeru ve třech po sobě následujících odběrech u nemocného bez terapie, i když jsou výsledky v referenčním rozmezí, je třeba považovat za podezřelý z recidivy, resp. progresu onemocnění. Během terapie se jako progresu hodnotí nárůst o více než 25 %, jako parciální remise pokles o více než 50 % původní hodnoty. Prognostický význam mohou mít odchylky od očekávaného biologického poločasu. Rychlost růstu tumoru lze odhadnout podle času, za který vzroste koncentrace tumorového markeru dvojnásobně (doubling time). Uvádí se, že tumorové markery mohou upozornit na recidivu až o několik měsíců dříve než zobrazovací techniky. Existují doporučení, jak často kontrolovat hladinu tumorového markeru v určitém období po primární terapii. K hodnocení pravděpodobnosti trvání remise či recidivy onemocnění i vhodných intervalů pro další kontrolu se s výhodou využívají expertní programy (např. CRACTES, tj. Cancer Recurrence Analysis, Correlation, Testing and Statistics) (Nekulová, 2006).

4.3 Vyšetřovaný materiál

V současnosti se většina používaných solubilních nádorových markerů stanovuje v séru. Jde obvykle o štěpy velkých molekulárních komplexů, a proto nevykazují nádorové markery příliš velkou preanalytickou variabilitu. Pro správnou interpretaci změn v hladinách markerů, zejména při dlouhodobém sledování nemocných s nádorovými chorobami, je třeba vyloučit možné rušivé faktory, které by mohly stanovení ovlivnit už ve fázi preanalytické. V určitých případech mohou být výsledky analýzy ovlivněny některými postupy klinického vyšetřování; např. pro stanovení prostatického specifického antigenu (PSA) má být odebrána krev nejdříve 48 hod.

po rektálním vyšetření prostaty, ovlivnit jeho hladinu může i jakákoliv manipulace s prostatou včetně jízdy na kole nebo sexuální aktivity (Internet 1).

Příprava tkání k analýze tkáňových nádorových markerů se řídí standardními operačními postupy spádové bioptické laboratoře. Nádorovou tkáň určenou k vyšetření je třeba co nejrychleji doručit do laboratoře, aby se minimalizovala autolýza do okamžiku fixace materiálu (Internet 1).

4.4 Metody pro stanovení tumorových markerů a jejich principy

Tumorové markery se stanovují většinou pomocí imunoanalytických metod, jako je radioimunologická analýza (RIA), imunoradiometrická analýza IRMA, enzymová imunoanalýza (ELISA). Ve stále větší míře se používají automatizované imunoanalytické systémy, které využívají buď výše uvedené metody značení, nebo fluorescenční či chemiluminiscenční značky. Jsou sice podstatně dražší, ale práce s nimi je pro technický personál méně náročná (Zima, 2002).

Základní princip těchto metod je reakce antigenu a protilátky. Reakce probíhá v tekutém prostředí nebo v prostředí gelu. Antigeny (ev. protilátky) bývají navázané na nejrůznější nosiče (skleněné, latexové, stěny jamek polystyrenových mikrotitračních destiček či stěny zkumavek). Rozmanité mohou být i cesty detekce reakce antigenu a protilátek. Začínají odečtením nativního nebo obarveného precipitátu, změřením zřádku vzniklého po reakci antigen-protilátka, vizualizací pomocí systému enzym-substrát, izotopově, elektrochemicky, imunofluorescenčně nebo fluorometricky. Řada metod je v současné době díky vyspělým technologiím automatizovaná (Bartůňková et al., 2005).

Za účelem jednotného posuzování validity markerů u jednotlivých nádorových onemocnění a pro standardizaci metod jejich vyšetřování byla v roce 1997 ustanovena mezinárodní komise EGTM (European Group of Tumour Markers). Existují i programy umožňující na základě 3 měření získaných v tříměsíčních intervalech stanovit pravděpodobný trend a odhadnout pravděpodobnost relapsu nebo progresu nádorového onemocnění v následujících 4-6 měsících (Klener, 2002).

4.4.1 Radioimunoanalýza (RIA) a imunoradiometrická analýza (IRMA)

Při těchto metodách se používá značení ^{125}I , což je gama-zářič, tedy zdroj tvrdého záření. Radioimunoanalýza a imunoradiometrie byly první moderní imunochemické metody, které využily tohoto radionuklidu a jsou dosud v klinické biochemii velmi rozšířeny (Internet 2). Radionuklidy se dají detekovat v nepatrných kvantech, a tudíž lze očekávat i mimořádnou citlivost metod (Jílek et al., 2002).

Pomocí RIA je možné stanovit prakticky každou vysokomolekulární i nízkomolekulární látku, pokud se proti ní dají připravit protilátky. Vyznačuje se vysokou citlivostí (řádově až 10^{-12} mol/l) a specifitou reakce. Tím je umožněno stanovovat i velmi nízké koncentrace řady látek přímo v biologických tekutinách bez předchozího přečištění nebo zahuštění. Podstatou metody je sledování reakce, při níž soutěží antigen ze vzorku s antigenem značeným radioizotopem o vazebná místa na protilátce, specifické pro daný antigen. Vznikají dva druhy komplexů radioaktivní a neradioaktivní, podle toho, který z antigenů se navázal na protilátku. Oddělením lze získat dva podíly: jeden obsahuje komplexy antigen-protilátka a druhý volné antigeny. Při měření radioaktivity je možné postupovat dvěma způsoby: 1.) Měří se radioaktivita vzniklých komplexů. Radioaktivita bude tím vyšší, čím nižší je koncentrace neznačeného antigenu. 2.) Měří se radioaktivita podílu, který obsahuje volné antigeny. U tohoto měření radioaktivita vzrůstá s koncentrací určovaného (neznačeného) antigenu. Z koncentrací standardních roztoků a naměřené radioaktivity se sestrojí příslušný kalibrační graf podle zvoleného postupu stanovení. RIA metody patří k nejcitlivějším rutinním laboratorním metodám, přesto se od jejich používání upouští. Důvodem je hlavně radiační riziko a nákladnost detekčního zařízení. Stále více se prosazují metody imunoenzymové, které dosahují citlivosti RIA a nemají její rizika a přístrojové nároky (Jílek et al., 2002).

Při metodě imunoradiometrické (IRMA) je značená protilátka. Jde o nekompetitivní metodu, kdy se na kotvící protilátku (na pevné fázi) naváže stanovovaný antigen, a pak se přidává druhá protilátka (značená ^{125}I) v nadbytku. Tento typ metod se označuje jako sendvičové (Internet 2).

4.4.2 Enzymová imunoanalýza (EIA)

Principem imunoenzymatických metod je značení antigenů nebo (častěji) protilátek enzymem. Pokud vznikne komplex antigen-protilátka, stává se jeho součástí i enzym. Zatímco identifikace nepatrných kvant komplexů antigen-protilátka je obtížná, identifikace enzymu je snadná. Využívají se totiž dostupné a odolné enzymy (křenová peroxidáza), které katalyzují vhodnou barevnou reakci, zpravidla mění bezbarvý substrát na výrazně barevný produkt. Přitom jedna molekula enzymu může změnit nesčetné množství molekul substrátu, takže detekce komplexu je velmi citlivá. Lze stanovit látky v nano- i pikogramových množstvích (Jílek et al., 2002). Podle povahy substrátu je reakci možno detekovat spektrofotometricky, nefelometricky, fluorometricky a luminometricky (Bartůňková et al., 2005).

EIA metody lze rozdělit na heterogenní (vyžadující separaci volné a vázané frakce analytu) a homogenní (nevyžadující tuto separaci). Heterogenní EIA mohou být kompetitivní (buď se značenou protilátkou nebo značeným antigenem) nebo mohou být nekompetitivní (se značenou protilátkou) (Bartůňková et al., 2005).

Metoda ELISA (enzymová imunoanalýza) je buď heterogenní nekompetitivní EIA (tzv. sandwich) nebo heterogenní kompetitivní EIA. Jednoduše se dá říct, že ELISA je speciálním druhem EIA. V současné době je drtivá většina metod postavena právě na principu heterogenní kompetitivní EIA se značenou protilátkou, tedy ELISA. Reakce probíhá tak, že protilátka je navázána na pevnou fázi a po kompetitivní reakci s antigenem se v neznámém vzorku ustaví rovnováha. Nenavázaný konjugát je odstraněn z reakční směsi promytím a konjugát vázaný na pevné fázi je inkubován s enzymovým substrátem a změřen (Bartůňková et al., 2005).

Praktický princip je takový, že na polystyrenovou mikrotitrační destičku o 96 jamkách je navázána na stěny jamek protilátka proti vyšetřovanému antigenu. Může být navázána pouhou absorpcí, ale většina protilátek je navázána chemicky pomocí různých vazeb (např. kovalentních). Místa polystyrenu, která nejsou obsazena, se blokují inertní bílkovinou (např. albuminem). Do jamky se přidá naředěný vzorek obsahující antigen a určitou dobu se inkubuje. Nenavázané složky se vymyjí a přidá se tzv. druhá protilátka s navázaným enzymem (konjugát). Po opětovné inkubaci a promytí se reakce vizualizuje přidáním substrátu, který je štěpen enzymem navázaným na druhou protilátku. Vzniklá barevná reakce se měří fotometricky (Bartůňková et al., 2005).

4.4.3 Imunofluorescenční analýza

Podstatou imunofluorescenčních metod je průkaz komplexu antigen-protilátka s využitím označení jedné složky reakce fluoreskujícím barvivem, např. izokyanátem fluoresceinu, tetrametylrodaminem apod. Tato barviva mohou být navázána na protilátku bez narušení její vazné vlastnosti a specifity. Takto označená protilátka může být použita např. k detekci antigenu přítomného v nátěru nebo histologickém řezu. K detekci se používá mikroskop s vhodným optickým systémem – fluorescenční mikroskop. Fluorescenční barvivo opět činí metodu výrazně citlivější, neboť jeho světélkování je daleko výraznější než barevný efekt konvenčního barviva (Jílek et al., 2002).

Přímá imunofluorescence: Protilátka proti antigenům je označena (konjugována) fluoresceinizotiokyanátem (FITC). Na mikroskopické sklíčko s fixovaným antigenem (nátěrem materiálů, histologickým řezem) se aplikuje konjugát a inkubuje se při 37 °C (resp. při pokojové teplotě) 30 minut ve vlhké komůrce. Po této době se preparát opakovaně (nejméně 3x) promyje fyziologickým roztokem, čímž se odstraní nenavázaná značená protilátka. Prohlíží se ve fluorescenčním mikroskopu ve zvětšení, které odpovídá předpokládanému hledanému objektu. Pozitivní nález se projeví jasnou žlutozelenou barvou daného objektu. Tato metoda se v posledních letech široce uplatňuje při identifikaci membránových znaků na povrchu leukocytů, pro průkaz nádorových antigenů i pro další účely. Vedle mikroskopického hodnocení se používá často i průtoková cytometrie, kdy intenzitu fluorescence hodnotí průtokový cytometr (Jílek et al., 2002).

Metoda nepřímé imunofluorescence: Má dvě fáze. V první fázi reagují neznačené protilátky s antigenem a dochází k vytvoření komplexu. Ve druhé fázi se na zachycené protilátky navazuje značené antisérum proti globulinům vyšetřovaného séra. Značená antiimmunoglobulinová antiséra jsou univerzální a lze jimi identifikovat obecně např. lidské protilátky, takže není třeba každou protilátku konjugovat zvlášť (Jílek et al., 2002).

4.4.4 Chemiluminiscence

U chemiluminiscence je excitace elektronů vyvolána chemickou reakcí. Při návratu na základní úroveň dochází k vyzáření světla (Internet 3). Chemiluminiscence je z mnoha důvodů nejpoužívanější analytickou metodou v laboratořích klinické biochemie a imunochemie. Imunotesty využívají k analýze látek reakce antigen-protilátka. Analýza se provádí ve vyšetřovaných tělních tekutinách (krev, moč a další) jen ve velmi malých koncentracích (nano- či pikomolů/l). Metody se používají ke stanovení nepatrných koncentrací hormonů, bílkovin, léčiv, protilátek, receptorů. Jako chemiluminiscenční markery se používají buď luminofory (luminoly, akridinium ester) nebo chemiluminiscenční reakce katalyzované enzymy (např. peroxidázou) (Internet 4).

Mezi nesporné výhody použití chemiluminiscence patří vysoká citlivost (s pomocí chemiluminiscence lze stanovit až 600 molekul dané látky!) selektivita (světlo, které zachytí přístroj, vzniká pouze při reakci s hledanou látkou, žádnou jinou). Mezi další výhody patří vyšší bezpečnost práce a snazší likvidace odpadů (používané radioimunometrické metody pracují s životu nebezpečnými radioaktivními zářiči), rychlost a množství stanovení (pro měření velkých sérií vzorků se používají tzv. mikrotitrační destičky) (Internet 4).

4.5 Přehled soudobých tumorových markerů karcinomu prsu

Mezi hlavní humorální tumorové markery stanovované při diagnostice karcinomu prsu patří karcinoembryonální antigen (CEA) a nádorový antigen 15-3 (CA 15-3). Alternativně mohou být jako hlavní tumorové markery stanoveny další dva antigeny jako je nádorový antigen 549 (CA 549) a antigen mucinózních karcinomů (MCA).

Tumorové markery CA 15-3, CA 549 a MCA jsou si velmi podobné, a proto není ekonomické je stanovovat společně u jednoho pacienta. Stanovuje se vždy jen jeden z nich (Zima, 2002).

Doplňkově se stanovují následující humorální tumorové markery: nádorový antigen 125 (CA 125), fragmenty cytokeratinu (cytokeratinový fragment 21-1 [CYFRA 21-1] nebo tkáňový polypeptidový antigen [TPA]), beta2 - mikroglobulin (β_2M) a feritin.

Mezi buněčné markery stanovované u karcinomu prsu patří estrogenový receptor (ER) a progesteronový receptor (PR).

4.5.1 Karcinoembryonální antigen (CEA)

Antigen CEA je onkofetální glykoprotein s vysokým obsahem sacharidů (asi 55 %), který je sdružený s membránou nádorových buněk, odkud je uvolňován do cirkulace. Molekulová hmotnost je 180–200 kDa. Na polypeptidový řetězec, který je tvořen sedmi Ig doménami zakotvenými na povrchu buňky fosfatidylinositolovou vazbou, jsou navázány sacharidové řetězce vazbou N-acetylglukosaminu na asparagin. Heterogenita CEA molekul v histologicky odlišných nádorech je podmíněna strukturou sacharidové složky a stupněm glykosylace molekuly. CEA je termostabilní a rozpustný v kyselině chloristé. Degradace probíhá pravděpodobně prostřednictvím jater, kde po desialyzaci je molekula odbourána v hepatocytech (Internet 14). Patří k nejdéle stanovovaným nádorovým markerům (Internet 4).

Za fyziologických podmínek se CEA nachází jak ve fetální tkáni (embryonální střevo), tak i v dospělé epiteliální tkáni (Zima, 2002). Ve fetálním séru je prokazatelný od 8. týdne těhotenství. Jeho produkce je nejvyšší v období kolem 22. týdne gravidity. V dospělém věku je syntetizován v minimálním množství epiteliálními buňkami střevní sliznice, žaludku a bronchů. Biologický poločas se pohybuje mezi 2 – 16 dny (Internet 5). Fyziologické hodnoty se pohybují v rozsahu 0-5 $\mu\text{g/l}$ (Zima, 2002; Klener, 2002).

Karcinoembryonální antigen byl poprvé identifikován u nemocných s kolorektálním karcinomem (Klener, 2002). Maligní buňky u rakoviny tlustého střeva nemají bazální laminu a množí se v tkáni. Kromě toho nádorové buňky ztratily svou polaritu a CEA je distribuován po celém povrchu buněk. Je známo, že komponenty z plazmatické membrány jsou průběžně odštěpovány z povrchu plazmatické membrány jako váčky a přes lymfu se dostávají do krve. Jak nádor roste, CEA se akumuluje v krvi (Hammarström, 1999). Původní předpoklad, že bude dobrým indikátorem tumorů tlustého střeva, se zcela nepotvrdil. Není totiž dostatečně citlivý (při 90 % specifčnosti je jeho citlivost pro průkaz recidivy kolorektálního karcinomu jen 61 %) ani specifický (Nekulová, 2006).

Stanovení CEA je užitečné u diagnostiky karcinomu prsu zejména pro včasné odhalení relapsu onemocnění, neboť zvýšení jeho koncentrace předchází o několik měsíců klinické známky relapsu (Klener, 2002). Stanovení CEA je také vhodné pro potvrzení stadia choroby, rozhodnutí o průběhu terapie. Hodnoty vyšší než 10 µg/l znamenají obvykle progresi maligního procesu. Předoperační hodnoty CEA >40 µg/l jsou charakteristické pro kratší interval bezpříznakového přežití nemocných s karcinomem mléčné žlázy. Koncentrace vyšší než 50 µg/l svědčí s vysokou pravděpodobností o jaterních nebo kostních metastázách. Pokles hodnot CEA asi ve 4. týdnu po chirurgickém zákroku může poskytnout údaj o úspěšnosti terapie, podobně lze hodnotit efekt chemo- či radioterapie, pokud byly hodnoty před terapií zvýšené (Internet 5).

CEA se zvyšuje též u jiných karcinomů (žaludku, jater, pankreatu, plic). Vyšší hodnoty mohou být u jaterní cirhózy, u zánětlivých střevních onemocnění a u pankreatitidy (Klener, 2002). Vyšší hodnoty jsou někdy pozorovány i u kuřáků; zvýšení rizika rozvoje karcinomu plic u těchto osob ve srovnání s kuřáky majícími nízkou hodnotu CEA nebylo dosud prokázáno (Nekulová, 2006).

Stanovení karcinoembryonálního antigenu má význam i mimo krevní sérum a to hlavně v moči, pleurálním punktátu, ascitu i dalších tělních tekutinách u vybraných typů nádorů (Internet 5). Metoda používaná pro stanovení tohoto antigenu je nepřímá chemiluminiscenční imunoanalýza (CLIA) (Internet 8). Z velkého množství protilátek vytvořených proti CEA se většina váže do pěti nepřekrývajících se epitopových skupin (Internet 14).

CEA patří mezi nejvíc používané klinické nádorové markery. Hlavní důvod, proč je CEA užitečný jako sérový nádorový marker u rakovin, je pravděpodobně ten, že CEA je stabilní molekula. Antigen má poměrně omezený výskyt v normální dospělé tkáni a u pozitivních nádorů se vyskytuje na vysoké úrovni (Hammarström, 1999).

4.5.2 Nádorový antigen CA 15-3

CA 15-3 se strukturou řadí mezi komplexní glykokonjugáty spolu s CA 125 a MCA. Komplexní glykonjugáty jsou glykoproteiny, eventuelně glykolipidy, které jsou produkovány určitými buňkami plodu; bývají tedy obvykle řazeny k onkofetálním antigenům. Při jejich odhalení se vycházelo z předpokladu, že nádorové buňky uvolňují do krevního oběhu určité antigenní struktury, které lze v krvi prokázat. Homogenáty zhoubných nádorů byla imunizována laboratorní zvířata a po izolaci vhodných linií imunokompetentních buněk byly hybridomovou technikou připraveny buněčné linie produkující monoklonální protilátky proti glykoproteinovým strukturám na povrchu nádorových buněk. Tyto protilátky byly pak užity k detekci tumorových antigenů v séru pacientů. Většina těchto antigenů je značena písmeny CA (carbohydrate antigen) a čísla podle označení buněčné linie, jež produkuje příslušnou protilátku. I když uvedená stanovení postrádají potřebnou specifickou a citlivost a hodí se opět spíše pro kontrolu průběhu onemocnění po léčbě, existuje množství firemně vyráběných souprav. Soupravy jednotlivých firem užívají odlišné monoklonální protilátky, zaměřené proti různým epitopům, a proto poskytují u téhož pacienta mnohdy výrazně odlišné výsledky. Při sledování průběhu onemocnění tedy nelze měnit druh soupravy (Nekulová, 2006).

CA 15-3 je definován dvěma monoklonálními protilátkami DF3 a 115D8. Protilátka 115D8 byla připravena proti tukovým membránovým globulím mateřského mléka, zatímco DF3 protilátka byla navázána proti membránově bohaté frakci lidského karcinomu prsu. Molekula CA 15-3 je mucin, jedná se o produkt mucinového genu 1 (MUC1). Jiné názvy pro tento mucin jsou polymorfní epiteliální mucin (PEM), epiteliální membránový antigen (EMA), nebo epialin. Antigen MUC 1 je transmembránový glykoprotein obsahující velké extracelulární domény. Antigen obsahuje také hydrofobní membránovou oblast o 31 aminokyselinách a cytoplazmatické domény složené z 69 aminokyselin (Duffy, 1999). Relativní molekulová hmotnost CA 15-3 je okolo 300 kDa (Zima, 2002). Biologický poločas je 7 dní. Marker nekolísá během ovulačního cyklu (Internet 6).

Varianta detekovaná monoklonální protilátkou DF3 je vhodná pro monitorování pacientek s metastazujícím nádorem prsu (Zima, 2002). Stanovení CA 15-3 se užívá k posouzení úspěchu léčby a včasné předpovědi recidivy u nemocných s karcinomem prsu (Nekulová, 2006). Senzitivita u neléčených nemocných dosahuje při 90 % specifitě hodnot pouze 20 - 40 %, u metastazujících nádorů až 80 %. Metodická "robustnost" CA 15-3 umožňuje sledovat a matematicky hodnotit dynamiku změn jeho koncentrací pro odhad vývoje onemocnění, které často předchází diagnostické zobrazovací metody. Jeho koncentrace obvykle koreluje s hmotou nádoru. Umožňuje předpovědět návrat onemocnění s předstihem několika měsíců (Internet 6).

Fyziologické hodnoty se pohybují v rozmezí 0-31 kU/l (Zima, 2002; Klener, 2002). U nemocných s karcinomem mléčné žlázy s parciální remisí je možno pozorovat i přetrvávající vyšší hodnoty (Internet 6).

V menší míře se vyskytují zvýšené hodnoty u karcinomu ovaria, děložního čípku, prostaty, plic a kolorekta (Klener, 2002). Mírné zvýšení se někdy pozoruje i u benigních onemocnění (hepatopatie, endometrióza, mastopatie) (Nekulová, 2006).

Mezi hlavní metodu stanovení patří nepřímá chemiluminiscenční imunoanalýza (CLIA) (Internet 8).

CA 15-3 je jedním z prvních cirkulujících prognostických faktorů u karcinomu prsu. Předoperační koncentrace mohou být kombinovány se stávajícími prognostickými faktory pro odhad výsledku u pacientů s nově diagnostikovanou rakovinou prsu. V současné době je nejdůležitější klinické použití CA 15-3 při monitorování terapie u pacientů s pokročilou rakovinou prsu, kterou není možné posoudit stávajícími klinickými nebo radiologickými postupy (Duffy, 2006).

4.5.3 Nádorový antigen CA 549

Molekula CA 549 je glykoprotein o molekulové hmotnosti asi 400 kDa. Antigen byl definován na podkladě dvou monoklonálních protilátek:

- 1) proti membránové frakci buněčné linie karcinomu prsu (BC 4E),
 - 2) proti HMFGP (lidský protein tukových globulí mléka; BC 4N 154) (Internet 15).
- CA 549 patří do rodiny membránových antigenů mléčných tukových globulí (jako CA 15-3) (Zima, 2002). Je přítomný na membránách normálních epiteliálních buněk (Internet 15). Jeho distribuce v nádorové tkáni je poněkud odlišná od CA 15-3.

Někteří autoři udávají, že lépe signalizuje postižení axilárních uzlin metastatickým procesem. Klinická senzitivita bývá udávána mezi 30-50 % při specifitě 75-90 % (Zima, 2002). Cut off hodnota je 12 U/ml (Klener, 2002). Antigen může být zvýšený i u jiných typů nádorů, nejčastěji u ovariálních, jaterních a plicních (Zima, 2002).

4.5.4 Antigen mucinózních karcinomů (MCA)

MCA může být také řazen mezi markery onkofetální povahy (Nekulová, 2006). MCA byl objeven pomocí techniky monoklonálních protilátek po imunizaci buňkami nádorové linie karcinomu prsu. Jedná se o vysokomolekulární (asi 350 kDa), silně glykosylovaný glykoprotein. Podobný antigen byl nalezen i v mateřském mléce (Zima, 2002).

Zvýšený výskyt se prokazuje u všech typů nádorů prsu. Klinická senzitivita se pohybuje mezi 40-80 %, specifita mezi 80-98 %. Marker dobře prokazuje metastázy, progresi i regresi nádoru (Zima, 2002). Cut off hodnota je 1,5 µg/l (Klener, 2002).

Tento antigen bývá často zvýšený i u jiných typů nádorů, hlavně u renálního karcinomu (65 %), urologických karcinomů z přechodných buněk (70 %), gynekologických nádorů (50 %), gastrointestinálních a plicních nádorů (30-40 %) a u 20 % karcinomů prostaty (Zima, 2002). Jeho vzestup při progresi onemocnění nastává dříve než vzestup CA 15-3 (Klener, 2002).

4.5.5 Nádorový antigen CA 125

CA 125 je vysokomolekulární glykoprotein o relativní molekulové hmotnosti okolo 200 kDa, byl poprvé prokázán na povrchu buněk ovariálního karcinomu (Nekulová, 2006). V dospělém věku může být omezeně syntetizován v epitelu normální tkáně vejcovodů, bronchů, endometria, cervixu, ale i v mezotelu pleury, perikardu a peritonea. Není prokazatelný v epitelu normálních ovarií. Chirurgický zásah v břišní dutině může vyprovokovat zvýšený pohyb CA 125 do cirkulace z mezotelu. Biologický poločas se udává asi 4 dny. Ca 125 je degradován prostřednictvím jater a vylučován ledvinami (Internet 7).

Koncentrace se zvyšuje u karcinomu prsu, ale mnohem větší význam má pro stanovení karcinomu ovaria, kde se vyskytuje asi u 80 % nemocných (Klener, 2002). Význam zvýšení hodnot CA 125 u karcinomu prsu je nejistý, přestože tvorba CA 125 byla prokázána v normálním prsu. Zvýšení CA 125 u rakoviny prsu souvisí často se

zapojením prsu do metastatického procesu pleury. Neustále jsou požadovány informace o roli CA 125 v rakovině prsu (Leonard et al., 2004).

Vyšetření CA 125 bývá nejčastěji užito k monitorování průběhu onemocnění (detekce relapsu či rozsevu onemocnění a odpovědi na léčbu). Serózní typ karcinomu ovarii, kde je CA 125 markerem první volby, vykazuje senzitivitu až 90 %. Nárůst koncentrace markeru může předcházet klinickou diagnózu o 1 – 8 měsíců. Při dokonalém odstranění primárního tumoru klesá koncentrace CA 125 o 75 – 90 % během prvního týdne (často exponenciálně), do 2 – 3 týdnů se hodnoty normalizují. CA 125 je vhodný pro potvrzení stadia choroby. Vysoké hodnoty, které se po primární terapii nesníží, jsou indikací k "second look" operaci. Senzitivita a specificita stanovení kolísá podle typu sledovaného nádoru a stadia onemocnění. Vzhledem k nízké senzitivitě (obzvláště stadium I – pouze asi 50 %) a nízké specificitě není vhodné provádět screening u nesymptomatické populace. V případě genetické zátěže (alespoň jeden příbuzný) se syndromem ovariálního karcinomu, je doporučeno stanovovat CA 125 (spolu s vaginálním ultrazvukovým vyšetřením) každoročně. (Internet 7). Fyziologické hodnoty jsou 0-35 kU/l (Zima, 2002; Klener, 2002).

Z nádorových onemocnění se antigen zvyšuje také u karcinomu pankreatu, plic, žlučových cest. CA 125 zřejmě reflektuje především postižení pleury a peritonea z důvodů infiltrace nádorovými strukturami. Byla prokázána rovněž zvýšená hladina CA 125 u nemocných s hepatocelulárním karcinomem. V procesu chronického onemocnění jater nebo peritonitidy může hladina CA 125 dosáhnout hodnot i vyšších než 65 kU/l. V přítomnosti maligního procesu koreluje obvykle s nádorovou hmotou (Internet 7). Mírné zvýšení lze nalézt také u endometriózy a u jaterní cirhózy (Klener, 2002).

Mezi používané metody stanovení tohoto antigenu patří nepřímá chemiluminiscenční imunoanalýza (CLIA) (Internet 8).

V klinické praxi má CA 125 několik důležitých rolí. Zvýšené CA-125 u postmenopauzálních pacientek s podezřelou pánevní hmotností zvyšuje možnost ovariálního karcinomu, tedy směřování pacienta směrem ke gynekologickému onkologovi k dalšímu řešení. Klesající úroveň CA-125 během chemoterapie ujistí lékaře i pacienta, že nádor reaguje. Rostoucí hladina CA-125 během chemoterapie ukazuje na vývoj rezistence. To vede k přerušení neefektivní terapie (Rustin et al., 2004).

4.5.6 Cytokeratiny

Mezi tři cytoskeletální systémy nalézané v eukaryotických buňkách patří i intermediální filamenta (IF). V závislosti na jejich polymeračních vlastnostech a tkáňové specificitě jsou rozděleny do šesti podtypů. Intermediální filamenta typu I a typu II jsou cytokeratiny (CK). CK tvoří největší podskupinu intermediálních filament a představují nejhojnější bílkoviny v epiteliálních buňkách. V závislosti na jejich tkáňové expresi, jsou cytokeratiny řazeny do jednoduchých epiteliálních cytokeratinů (CK 7, 8, 18, 19, 20) a stratifikovaných epiteliálních cytokeratinů (CK 4, 5, 12, 14 atd.). Nejhojnější epitelové cytokeratiny jsou CK 8, 18 a 19 (Sawant et al., 2007).

1.) Cytokeratinový fragment 21-1 (CYFRA 21-1)

Mezi cytokeratiny patří právě CYFRA 21-1. CK 19 je typ-I CK, které se uvolní v séru jako rozpustné fragmenty. CK 19 je protein o molekulové hmotnosti 40 kDa, který může být proteolyticky štěpen kaspázou-3 (Sawant et al., 2007). Dosud bylo vyvinuto a testováno několik protilátek proti tomuto markeru, z nichž KS 9–11 a BM 19–21 se staly podkladem různých komerčních imunochemických souprav. Jsou definovány epitopy rozpoznávané těmito protilátkami. Fyziologicky je cytokeratinový fragment 21-1 prokazatelný ve tkáni plic, dělohy a trávicího ústrojí. Degradace CYFRA 21-1 probíhá játry, a vylučován je ledvinami (Internet 9).

Tento tumorový marker se osvědčil jako marker u nemalobuněčného karcinomu plic (pozitivní u 40-50 % nemocných), u karcinomů ovaria (včetně mucinózních), u karcinomu prsu, dělohy a žaludku (Klener, 2002). Rozmezí fyziologických hodnot je 0,0-3,3 µg/l (Zima, 2002; Klener, 2002). Nespecifické zvýšení CYFRA 21-1 je možno pozorovat při některých onemocněních jater (cirhóza, hepatitida), rovněž i u infekčních onemocnění. Falešně pozitivní hodnoty nalézáme u astmatu (Internet 9). Mezi metodu, která stanovuje CYFRA 21-1, patří elektro-chemiluminiscenční imunoanalýza (ECLIA) (Internet 8).

2.) Tkáňový polypeptidový antigen (TPA)

TPA je jeden z nejstarších používaných nádorových markerů. Bylo prokázáno, že TPA imunologicky souvisí se směsí non-epidermálního CK, jako CK 8, 18 a 19 (Sawant et al., 2007) o relativní molekulové hmotnosti okolo 22 000 Da (Zima, 2002). TPA je tvořen v S a G2 fázi buněčného cyklu. TPA je vylučován do oběhu v průběhu a bezprostředně po mitóze. Koncentrace antigenu je vyšší u nádorových tkání a v sérech

pacientů s rakovinou ve srovnání s normální tkání nebo normálními séry. V posledních letech není TPA často používán díky své široké specificitě (Sawant et al., 2007). TPA může být prokázán prakticky ve všech buňkách epitelového původu (Nekulová, 2006). TPA je prokazován méně specifickými polyklonálními protilátkami; tento zastaralý test je nahrazován testem označovaným jako TPA_{cyk}, který používá monoklonální protilátky proti cytokeratinu 8 a 18 (Internet 11).

TPA není specifickým indikátorem určitého nádoru, ale spíše ukazatelem buněčné proliferace. Převažuje tedy u něj citlivost nad specifícností. Z tohoto důvodu je zvýšený u řady rychle rostoucích zhoubných nádorů (karcinomu prsu, bronchiálního, kolorektálního, močového měchýře, ovaria, děložního čípku). Zvýšení TPA se nachází i u proliferace nenádorového původu, např. u zánětlivých chorob plic, jater a urogenitálního ústrojí. V případě účinné terapie a zastavení buněčné proliferace koncentrace TPA rychle klesá, mnohem zřetelněji než v případě ostatních markerů (Nekulová, 2006).

Fyziologické meze jsou 0,0-1,0 µg/l (Zima, 2002) a metoda, kterou se dá tento antigen stanovit je imunoradiometrická analýza (IRMA) (Internet 8).

Jiné fragmenty keratinu představují tzv. specifický TPA (TPS) (Nekulová, 2006). Tkáňový polypeptidový specifický antigen (TPS) byl identifikován už dávno z lidských karcinomů a buněčných linií pomocí protilátek směřujících k nerozpustnému nádorovému materiálu. Tyto protilátky byly zobrazeny barvením cytoskeletálních intermediálních filament v HeLa buňkách (Sawant et al, 2007). Na rozdíl od TPA je stanovován monoklonální protilátkou (M3) proti jednomu epitopu - CK 18 (Internet 11). TPS se jeví více specifický pro karcinom prsu a ovaria (Zima, 2002). Jeho koncentrace může vrůst i u dalších karcinomů jako je karcinom průdušek, tlustého střeva, močového měchýře, varlat, prostaty a pankreatu. Zvýšení TPS bylo nalezeno též u maligních solidních tumorů dětského věku (tedy i nonepitelových). Je otázka, zda toto zvýšení není spíše projevem nějaké komplikace (sepsy, těžší infekce) (Internet 11).

Klinické užití cytokeratinových nádorových markerů je dobře zavedeno pro sledování pacientů s epiteliálními buněčnými karcinomy. Cytokeratiny odrážejí aktivitu nádorových buněk. Opakovanými testy na cytokeratiny u pacientů v kombinaci s markery, které odrážejí nádorové zatížení, může onkolog získat důležité informace o aktivitě nádorového

růstu. To se vztahuje zejména na případy, kdy nádor je již klinicky potvrzen. Schopnost cytokeratinových markerů předpovědět stav onemocnění dřív než konvenční metody, nabízí spolehlivý nástroj pro efektivnější léčbu. Cytokeratinové markery nejsou orgánově specifické, což omezuje jejich diagnostické užití. Nicméně, jejich použití je dobře zavedeno v monitorování symptomatických pacientů během léčby (radioterapie, endokrinní terapie, chemoterapie) (Barak et al., 2004).

4.5.7 Beta2 - mikroglobulin

Beta2 – mikroglobulin spolu s feritinem patří mezi sérové proteiny. Některé sérové proteiny jsou produkovány nádorovými buňkami, jindy přítomnost nádoru a jeho růst vyvolá reakci organismu, projevující se změnou koncentrace sérových bílkovin. Tyto změny jsou jen velmi málo specifické pro zhoubné novotvary a ani citlivost není příliš vysoká. Reaktivní změny při jejich nálezů mohou upozornit na přítomnost zhoubného novotvaru (Nekulová, 2006).

Beta2 – mikroglobulin je polypeptid, který je součástí povrchové membrány všech buněk (Klener, 2002). Jeho relativní molekulová hmotnost je 11 800 Da, polypeptidový řetězec má 100 aminokyselin a vytváří disulfidický můstek mezi 25. a 81. aminokyselinou. Jeho syntéza je nejvyšší v buňkách B lymfocytární řady, nachází se však ve většině buněk, snad s výjimkou erytrocytů a buněk trofoblastu (Zima, 2002). Při rozpadu buněk se uvolňuje do plazmy, vylučuje se glomerulární filtrací a po reabsorpci je degradován tubulárními buňkami (Klener, 2002). Biologický poločas je 20 minut až 2 hodiny (Internet 8).

Při poruše ledvin je nutno opatrně interpretovat změny obsahu β_2M v krvi i v moči. Při poruše glomerulární filtrace se jeho obsah v séru může výrazně zvyšovat, při tubulární poruše vážně jeho reabsorpce v ledvinách, což může mít za následek nízký obsah v krvi a zvýšený v moči. Tohoto jevu se užívá v diferenciální diagnostice ledvinových onemocnění (Zima, 2002). Koncentrace β_2M se u karcinomu prsu zvyšuje v menší míře (Klener, 2002).

Fyziologické hodnoty β_2M jsou 1,0-2,4 mg/l (Zima, 2002). Cut off hodnota je 2 mg/l. Koncentrace β_2M se zvyšuje také u lymfoproliferačních onemocnění (lymfomy, myelom) a v menší míře u nádorů GITu a plic (Klener, 2002). Zvýšení β_2M je možno pozorovat i u pacientů s chronickými zánětlivými a autoimunitními onemocněními, včetně kolagenóz a revmatoidní artritidy, u syndromu získaného selhání imunity (AIDS)

a po transplantacích orgánů. I zde je možnost využití pro monitorování stavu pacienta (Zima, 2002).

Mezi hlavní metodu, kterou se β_2 M stanovuje, patří MEIA (enzymová imunoanalýza na mikročasticích) (Internet 8).

4.5.8 Feritin

Feritin je vysokomolekulární bílkovina, sloužící jako zásobárna železa ve střevní sliznici a kostní dřeni. Zvýšení syntézy je indukováno nedostatkem železa v organismu. Biologický poločas není znám (Internet 8).

Feritin bývá v porovnání s ostatními markery karcinomu prsu zvýšen méně často. (Nekulová, 2006). Fyziologické hodnoty jsou odlišné u mužů a žen. U mužů 21,8-275,0 $\mu\text{g/l}$, u žen 4,6-204,0 $\mu\text{g/l}$ (Zima, 2002). Cut off hodnota je pro muže 300 $\mu\text{g/l}$ a pro ženy 200 $\mu\text{g/l}$ (Klener, 2002).

Feritin se používá také jako nádorový marker u primárních a sekundárních nádorů jater a u pankreatu. Zvýšen bývá též u leukémií, Hodgkinovy choroby a u neuroblastomu (Klener, 2002).

Mezi metody, kterými se feritin stanovuje, patří imunoturbidimetrie (IT) a nepřímá chemiluminiscenční imunoanalýza (CLIA) (Internet 8).

4.5.9 Hormonální receptory

Hormonální receptory řadíme mezi buněčné tumorové markery. Buněčné tumorové markery jsou komponenty buněčné membrány či jiných organel, typické pro nádorovou buňku nebo mající význam pro diagnostiku a léčbu nádorového onemocnění. Neuvolňují se do krevního oběhu a musí se prokazovat v buněčných homogenátech nebo in situ (Nekulová, 2006).

Patří sem např. hormonální receptory u karcinomu mléčné žlázy. Prokazují se v homogenátu nádorové tkáně nebo lépe imunohistochemicky. Nález receptorů estrogenů a progesteronu je známkou větší diferenciaci nádorových buněk a vypovídá o jejich senzitivě k hormonální léčbě (Nekulová, 2006).

V onkologické praxi se nejčastěji stanovují steroidní receptory v cytoplazmě nebo v jaderné frakci. Stanovení jaderných receptorů je však technicky obtížné, proto se dává

přednost stanovení cytoplazmatických receptorů. Existují tři základní způsoby jejich stanovení:

Biochemické metody: Tyto metody jsou nejběžnější. Receptory se stanoví pomocí značených ligandů. Vzorky primárního karcinomu nebo metastázy odebrané při operaci jsou zbaveny tukové a normální tkáně. Pak jsou vzorky zmrazeny tekutým dusíkem na teploty kolem $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ve zmrazeném stavu je tkáň pulverizována, pak homogenizována ve vhodných nárazníkových roztocích a homogenát je odstředěn. Receptory se určí v cytosolové frakci, která je obsažena v supernatantu. Frakce se inkubuje při nízké teplotě ($0-4\text{ }^{\circ}\text{C}$) s hormonem značeným β nebo γ zářičem. Vhodnou fyzikální metodou např. aktivním uhlím s dextranem se oddělí značený steroid vázaný na bílkovinu a změří se jeho aktivita. Výsledek se vyjadřuje ve fentomolech (10^{-15} molu) značeného steroidu na 1 mg homogenizované tkáně nebo na 1 mg cytosolové bílkoviny (Klener, 2002).

Histologické metody: Záleží na znázornění receptorů v tkáňovém řezu. Toho lze dosáhnout několika způsoby:

- při autoradiografii se sleduje dislokace značeného steroidu v preparátu,
- fluorescenční metody využívají ke znázornění receptorů fluorescenční látky navázané na označený steroid nebo častěji konjugát steroidu s makromolekulárním nosičem,
- enzymové metody využívají vazby enzymu (nejčastěji křenové peroxidázy) na steroidy nebo jejich konjugáty. Po přidání substrátu se přítomnost enzymu v preparátu projeví barevnou reakcí (Klener, 2002).

Enzymoimunochemické metody: princip je stejný jako u enzymových metod, ale enzym je navázán na protilátky proti konjugátům steroidů s makromolekulárními nosiči (Klener, 2002).

Stanovení estrogenních receptorů (ER) u karcinomu mammy patří po mnoho let k základním indikátorům pravděpodobné výhody hormonální terapie pro individuálního pacienta. Podle hladiny ER je rovněž určována obecná prognóza vývoje onemocnění (Internet 12). Pozitivita receptorů je indikací k terapii antiestrogeny. Vypovídá o větší diferenciaci nádorových buněk, menší invazivitě a lepší prognóze onemocnění (Internet 13). Fyziologické hodnoty (ER) a (PR) jsou 6-10 nmol/l (Zima, 2002).

Estrogenové receptory patří do superrodiny nukleárních receptorů. Je-li na ER navázán ligand, translokuje se z cytoplasmy do jádra a reaguje s koaktivátory nebo korepresory transkripce s efektem výsledného ovlivnění cílových genů (Internet 12).

V lidském organismu se vyskytují dvě izoformy ER (ER- α a ER- β), které jsou kódovány nezávislými geny. Obě izoformy ER mají různé role v oblasti regulace genové exprese. V současné době se zjišťuje, zda některé mutace nebo modifikace receptoru ER- β hrají nějakou roli v rozvoji rakoviny prsu (v prognóze) a v reakci na endokrinní terapii. Úloha ER- β v prsu není dosud objasněna, ale přítomnost ER- α v době diagnózy je indikace pro endokrinní terapii (Giacinti et al., 2005).

Gen ER- α je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 6, je tvořen 8 exony. Kóduje protein o molekulové hmotnosti asi 65 kDa (595 aminokyselin), který se váže k estradiolu s vysokou afinitou. Gen pro ER- β je umístěn na chromozomu 14, kóduje protein sestávající z 530 aminokyselin (Internet 12).

Šedesát procent případů primární rakoviny prsu jsou ER-pozitivní a dvě třetiny pokročilé ER-pozitivní rakoviny prsu reagují na terapii antiestrogeny, jako je tamoxifen. Nicméně u více než jedné třetiny případů je v době diagnózy nedostatek ER- α a další, původně ER- α pozitivní ztratí schopnost exprimovat tyto receptory během progresu tumoru. Tyto případy neumožňují endokrinní terapii a zvyšují špatné klinické výsledky. Neschopnost buněk exprimovat ER- α je u řady karcinomů prsu způsobeno neobvyklou metylací regulačních oblastí genu pro ER- α , především úseků bohatých na cytosin a guanin (Giacinti et al., 2005).

Přestože poznání ER funkce, heterogenity molekuly, ani metodický přístup není zdaleka dokončen, jejich vyšetření v primárním nádoru má nezastupitelnou úlohu při určení typu terapie (Internet 12).

Progesteronové receptory (PR) patří k doplňujícím parametrům pro vyšetření hormonálního stavu nemocné s karcinomem prsu. Vzhledem k tomu, že PR patří k bílkovinám indukovaným působením ER, je dosud sporný význam skupiny ER negativní a zároveň PR pozitivní (Internet 12).

4.6 Nejnovější tumorové markery objevené pro diagnostiku rakoviny prsu

Mezi nejnovější tumorové markery využívané pro laboratorní diagnostiku karcinomu prsu patří receptor pro epidermální růstový faktor HER-2/neu, urokináza (u-PA) a inhibitor aktivátorů plazminogenu 1 (PAI-1).

4.6.1 Receptor pro epidermální růstový faktor (HER-2/neu)

HER-2/neu je glykoprotein o molekulové hmotnosti 185 kDa, normálně je produkován epitelii mnoha orgánů, jako jsou plíce, močový měchýř, slinivka břišní, prsa a prostata. Produkce HER-2/neu z epitelálních nádorů vede k silnému nárůstu hustoty HER-2/neu v buněčných membránách. HER-2/neu je člen rodiny receptorů epidermálních růstových faktorů (EGFR). Proteinový receptor HER-2/neu má tři domény. První doména je intracelulární tyrosin-kinázová, další je hydrofobní transmembránová doména a poslední je extracelulární doména, na kterou se váže ligand-epidermální růstový faktor (Lüftner et al., 2003).

Genová amplifikace HER-2/neu, anebo produkce proteinu jsou zjištěny přibližně u 25 až 30 % primárních rakovin prsu. Nádory s pozitivitou HER-2/neu mívají v některých případech negativní steroidní hormonální receptory. Tyto nádory jsou spojené s výskytem pozitivních lymfatických uzlin a s vysokým skóre frakcí S-fáze. Zvýšená agresivita, metastatický potenciál a terapeutická odolnost HER-2/neu pozitivních nádorů může rovněž záležet na uvolňovacím procesu (Lüftner et al., 2003).

HER-2/neu genová amplifikace a proteinová produkce může být hodnocena v nádorové tkáni. Mezi metody stanovení proteinového HER-2/neu patří imunohistochemie (IHC), která byla považována za referenční metodu, neboli za zlatý standard v testování HER-2/neu. IHC zjišťuje stupeň HER-2/neu proteinové produkce ze vzorků tkáně pomocí mono- nebo polyklonálních protilátek, které se váží na HER-2/neu vytvořené na buněčných membránách. Výsledný komplex antigen-protilátka je vizualizován peroxidázou nebo jinou chromogenní substancí. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) měří počet genových kopií v jádru. U metody FISH se používají specifické DNA sondy, skládající se z oligonukleotidu, který je označený fluoresceinem. Pomocí FISH metody se zjistí přesný počet hybridizačních signálů v jádru. Protože DNA je méně náchylná k poškození během stanovení než epitelové

bílkoviny, bývá metoda FISH často považována za objektivnější metodu než IHC (Lüftner et al., 2003).

Sérová hladina HER-2/neu může odrážet stav aktivace spojený s uvolňovacím procesem. Měření sérových hodnot HER-2/neu poskytuje klinikovi prognostické a prediktivní informace a může být použito pro monitorování pacientů s metastatickou rakovinou prsu. Testování sérového HER-2/neu poskytuje doplňující informace k určení tkáňové hladiny HER-2/neu, která by se mohla časem změnit, což by vedlo k přehodnocení výběru pacienta pro specificky zaměřenou terapii (Lüftner et al., 2003).

Sérové hladiny HER-2/neu lze zjistit metedou ELISA. Testování sérového HER-2/neu užívá manuální nebo automatickou ELISA metodu, která je technicky robustní, nevyžaduje archivní materiály a je nezávislá na subjektivní interpretaci. Klinický význam sledování sérových hodnot HER-2/neu se zaručeně zvýší zavedením nových inovačních anti-HER-2/neu cílených terapií jako jsou např. nízkomolekulární inhibitory tyrosinkináz (Lüftner et al., 2003).

Specifické klinické výhody sérového HER-2/neu testování jsou objasněny četným vyšetřováním probíhajícím po celém světě. Některé studie naznačují roli HER-2/neu pro prognózu choroby a celkové přežití neboli předpověď. Ostatní zkoušky zvláště u populace s metastatickým karcinomem prsu, v porovnání s podskupinami pacientů s vyšší výchozí úrovní sérového HER-2/neu a v porovnání s podskupinou s normální výchozí koncentrací sérového HER-2/neu ukazují použití markeru pro předpověď odpovědi na léčbu (prediktivní role) (Lüftner et al., 2003).

Hlavní úlohy HER-2/neu jsou pro prognózu onemocnění, monitorování opakování nemoci a sledování pokročilého onemocnění (Lüftner et al., 2003).

HER-2/neu produkce není omezena pouze na rakovinu prsu. Je zaznamenána rovněž u jiných epidemiologicky důležitých solidních nádorů, mezi které patří nádor bronchiální, prostaty a vaječníků. Proto je pravděpodobné, že se klinická úloha sérového HER-2/neu v blízké budoucnosti bude dále vyvíjet stejně jako u rakoviny prsu (Lüftner et al., 2003).

4.6.2 Urokináza (u-PA) a inhibitor aktivátorů plazminogenu (PAI-1)

Urokináza patří mezi tkáňové aktivátory plazminogenu. Prourokináza (scu-PA) je jednořetězcová glykosylovaná proteáza serinového typu, která se nachází hlavně v ledvinách. Je uvolňována z endoteliálních buněk v přítomnosti endotoxinu nebo tumor nekrotizujícího faktoru (TNF). Prourokináza se nachází v nízké koncentraci v plazmě. Vlivem kontaktního systému (kalikrein, vysokomolekulární kininogen (HMWK), faktor 12a (F XIIa)) a plazminu přechází jednořetězcová (LMW: 31kDa) forma prourokinázy na aktivní dvouřetězcovou (HMW: 55kDa) formu urokinázy (u-PA). Urokináza je uvolňována v rámci fibrinolýzy a je rychle vyvázaná hlavním modulátorem fibrinolýzy PAI-1. V plazmě cirkuluje urokináza samostatně a poprvé byla izolována z moči. Biologický poločas se pohybuje okolo 6 min. Koncentrace v plazmě je 2-8 $\mu\text{g/l}$ (Pecka, 2004).

PAI-1 patří mezi přirozené inhibitory tkáňových aktivátorů plazminogenu. PAI-1 je syntetizován endoteliálními buňkami cév, megakaryocyty a hepatocyty (po stimulaci cytokiny). Inhibitor je jednořetězcový glykoprotein, který je z převážné části přítomen v α -granulích krevních destiček, v menší míře v endotelu a plazmě. Syntéza je regulována trombinem i některými hormony např. glukokortikoidy, či inzulinem. PAI-1 existuje ve dvou formách, glykosylované a neglykosylované. Molekulová hmotnost glykosylové formy je 52 kDa a neglykosylované formy je 43 kDa. Koncentrace v plazmě je 20-100 $\mu\text{g/l}$ (Pecka, 2004).

Urokináza a inhibitor aktivátoru plazminogenu jako ukazatele karcinomu prsu:

U-PA a PAI-1 jsou součástí fibrinolytického systému, který obsahuje receptor pro u-PA a další inhibitory (PAI-2 a PAI-3). Tento systém se podílí na invazi nádorů, angiogenezi a tvorbě metastáz (Harris et al., 2007).

Mezi metody používané pro hodnocení těchto markerů patří kvantitativní PCR v reálném čase prováděné pomocí reverzní transkriptázy (RT)-PCR a s enzym-spojené immunosorbentové testy (ELISA). K měření metodou ELISA je potřeba minimálně 300 mg čerstvé nebo mražené prsní tkáně nebo se používá cytosolická frakce zbývající po biochemickém hormonálně receptorovém měření. Metoda může být použita pro stanovení prognózy u pacientů s nově diagnostikovanou rakovinou prsu s negativními uzlinami (Harris et al., 2007). Koncentrace u-PA a PAI-1 koreluje pozitivně se špatnou prognózou i u pacientek v rané fázi rakoviny prsu s nepostiženými

lokálními mízními uzlinami a naopak nízká koncentrace ukazuje u této formy na dobrou prognózu s dlouhodobým přežíváním. U těchto pacientek není nutná adjuvantní chemoterapie (Masopust, 2004). Studie ukazují, že tyto dva kombinované markery jsou spojeny s 2- až 8- násobně vyšším rizikem recidivy rakoviny a smrti. U pacientek s negativními uzlinami, které nejsou léčeny adjuvantní systémovou terapií, byla prognostická hodnota obou markerů nezávislá na množství, stupni a úrovni hormonálních receptorů (Harris et al., 2007).

V budoucnosti se očekává, že stanovení těchto markerů umožní monitorování úspěšnosti léčby novými farmaky, které budou specificky zasahovat do nádorového procesu tím, že ovlivní účinky u-PA a/nebo PAI-1 (Harris et al., 2007).

Pravděpodobně podobný význam bude mít stanovení u-PA a PAI-1 u karcinomů žaludku, ezofagu, tlustého střeva, močového měchýře, ovaria nebo endometria (Masopust, 2004).

5 Závěr

Hlavním cílem bakalářské práce bylo podání přehledu tumorových markerů pro diagnostiku karcinomu prsu. V práci bylo představeno 9 humorálních markerů, 1 typ celulárních a 3 nejnovější markery. Všechny zmíněné markery se v praxi dohromady nikdy nepoužívají kvůli ekonomické náročnosti, a proto se vždy hledají ty nejlepší kombinace jednotlivých markerů. Kombinace markerů vedou k lepší diagnostické senzitivitě a specifitě. Jako nejčastější kombinace se používá CA 15-3, CEA a TPA. CA 15-3 s CEA jsou markery nejvhodnější pro diagnostiku karcinomu prsu, proto se používají jako markery hlavní. Stále však nespĺňují všechny požadavky na ideální tumorový marker. CA 15-3 je v diagnostice nejčastěji užíván pro posouzení úspěchu léčby a včasné předpovědi recidivy. CEA je považován za marker pro stanovení prognózy a stádia onemocnění. TPA je velice dobrým markerem proliferační aktivity a převažuje u něj senzitivita nad specifíčností. TPA bývá také v některých laboratořích nahrazeno markerem CA 125. CA 125 se spíš využívá pro diagnostiku karcinomu ovarií a v diagnostice rakoviny prsu má hlavní úlohu pro potvrzení stádia onemocnění.

Mezi méně využívané markery patří CYFRA 21-1, vyjadřující aktivitu nádorových buněk. Dalšími markery, které se v biochemických laboratořích prakticky nestanovují, jsou CA 549 a MCA. Hlavní úloha těchto markerů spočívá ve schopnosti prokázat metastatický proces. Beta2 – mikroglobulin a feritin se v praxi také příliš nepoužívají, ale jsou jedním z možných ukazatelů nádoru prsu. Jejich zvýšení může upozornit na možné riziko nádorového bujení. Větší prognostický význam mají tyto markery v nádorovém bujení krevních buněk.

Hormonální receptory korelují s onemocněním a jsou v laboratořích hojně používány, kvůli jejich častému výskytu u karcinomu prsu. Jejich hlavní význam spočívá v určení typu lékové terapie a určení prognózy onemocnění. HER-2/neu se využívá pro určení prognózy, monitorování opakování nemoci a také pro určení lékové terapie. U-PA a PAI-1 se zjišťují pro určení prognózy a recidivy onemocnění.

Tumorové markery jsou v dnešní době hojně používaným diagnostickým prvkem a často jsou aplikovány v situacích, kde nemají žádný užitečný význam a jsou spíš jen zbytečným plýtváním financí. Je nutné, aby lékaři a laboratorní pracovníci uměli interpretovat výsledky markerů a rozuměli jim. Tito odborníci by měli vědět,

že ne vždy, když je marker pozitivní, musí mít člověk dané nádorové onemocnění a zároveň akceptovali, že negativní hodnoty nádor nevylučují. Znali, jak může být stanovení markerů ovlivněno, a tyto chyby se snažili eliminovat.

Největším pozitivem tumorových markerů je jejich schopnost monitorovat průběh onemocnění a včas předpovědět jeho návrat. Tato kapitola klinické biochemie patří mezi obsáhlejší, neustále je v ní co objevovat, poznávat a hlavně zdokonalovat.

Pro přehlednost jsem vytvořila tabulku shrnující zmíněné markery. V tabulce jsem rozdělila jednotlivé markery podle zařazení do jednotlivých skupin, fyziologických hodnot, výskytu markerů u dalších nádorových onemocnění kromě rakoviny prsu a benigních onemocnění, u kterých se markery mohou zvyšovat. V neposlední řadě podle významu jejich použití v diagnostice karcinomu prsu. V tabulce se neobjevují nové markery, protože jsem o nich nezískala všechny potřebné informace.

Tabulka č. 1. Přehled tumorových markerů sledovaných u karcinomu prsu

Marker	Zařazení do skupiny	Fyziologické hodnoty	Nádorová onemocnění	Benigní onemocnění	Použití v diagnostice karcinomu prsu
CEA	Onkofetální antigeny	0-5 µg/l	Kolorektální, játra, plíce, žaludek	Kuřáci, cirhóza, záněty střev	Prognóza, stádia onemocnění
CA 15-3	Onkofetální antigeny	0-31 kU/l	Ovaria, prostata, plíce	Hepatopatie, mastopatie	Úspěch léčby, recidiva
CA 549	Onkofetální antigeny	Cut off 12 U/ml	Ovaria, plíce, játra	-----	Metastatický proces
MCA	Onkofetální antigeny	Cut off 1,5 µg/l	Ledviny, plíce, GIT, prostata	-----	Progrese, regrese nádoru
CA 125	Onkofetální antigeny	0-35 kU/l	Ovaria, pankreas	Cirhóza, peritonitida	Stádia onemocnění
CYFRA 21-1	Antigenní markery-cytokeratiny	0,0-3,3 µg/l	Plíce, ovaria, děloha	Cirhóza, infekční on.	Aktivita nádor. buněk
TPA	Antigenní markery-cytokeratiny	0,0-1,0 µg/l	Bronchiální, kolorektální, ovaria	Zánět plic, jater, GITU	Buněčná proliferace, senzitivita
B ₂ M	Sérové proteiny	1,0-2,4 mg/l	Lymfom, myelom, plíce, GIT	AIDS, transplantace	Reaktivní změny
Feritin	Sérové proteiny	M 21,8-275,0 µg/l; Ž 4,6-204,0 µg/l	Leukémie, neuroblastom	-----	Reaktivní změny
ER, PR	Hormonální receptory	6-10 nmol/l	-----	-----	Prognóza, určení typu terapie

6 Seznam zkratek

AFP	alfa-fetoprotein (alpha-fetoprotein)
BRCA-1	gen rakoviny prsu, včasného nástupu 1 (breast cancer 1, early onset)
BRCA-2	gen rakoviny prsu, včasného nástupu 2 (breast cancer 2, early onset)
CA 125	nádorový antigen 125 (carbohydrate antigen 125)
CA 15-3	nádorový antigen 15-3 (carbohydrate antigen 15-3)
CA 549	nádorový antigen 549 (carbohydrate antigen 549)
CEA	karcinoembryonální antigen (carcinoembryonic antigen)
CK	cytokeratin
CLIA	nepřímá chemiluminiscenční imunoanalýza (chemiluminescence immuno assay)
CRACTES	opakovaná analýza rakovin, korelace, testování, statistiky (cancer recurrence analysis, correlation, testing and statistics)
CYFRA 21-1	cytokeratinový fragment 21-1 (cytokeratin fragment 21-1)
DCIS	duktální karcinom in situ
ECLIA	elektro-chemiluminiscenční imunoanalýza (electro-chemiluminescence immuno assay)
EGFR	epidermální růstový faktor receptoru (epidermal growth factor receptor)
EGTM	evropská skupina tumorových markerů (european group of tumour markers)
ELISA	enzymová imunoanalýza (enzyme linked immunosorbent assay)
EMA	epiteliální membránový antigen (epithelial membráně antigen)
ER	estrogenový receptor (estrogen receptor)
F XIIa	faktor 12

FISH	fluorescenční in situ hybridizace (fluorescence-in situ hybridization)
FITC	fluoresceinizotiokyanát
GIT	gastrointestinální ústrojí
hCG	choriongonadotropin (human chorionic gonadotropin)
HER-2/neu	lidský receptor epidermálního růstového faktory (human epidermal growth factor receptor-2)
HMW	vysoká molekulová hmotnost (high molecular weight)
HMWK	vysokomolekulární kininogen (high molecular weight kininogen)
IF	intermediální filamenta
IHC	imunohistochemie (immunohistochemistry)
IRMA	imunoradiometrická analýza (immunoradiometric assay)
IT	imunoturbidimetrie
LCIS	lobulární karcinom in situ
LMW	nízká molekulová hmotnost (low molecular weight)
MCA	antigen mucinózních karcinomů (mucin like cancer associated antigen)
MEIA	enzymová imunoanalýza na mikročasticích (microparticle enzyme immuno assay)
MUC1	mucin 1
NSE	enoláza specifická pro neurony (neuron-specific enolase)
PAI-1	inhibitor aktivátorů plazminogenu
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PEM	polymorfní epiteliální mucin (polymorphic epithelial mucin)
PR	progesteronový receptor (progesterone receptor)
PSA	prostatický specifický antigen (prostatic specific antigen)

RIA	radioimunologická analýza, radioimunoanalýza (radioimmuno-assay)
RT	reverzní transkriptáza
scu-PA	prourokináza
TGF- β	transformační růstový faktor beta (transforming growth factor-beta)
TNF	tumor nekrotizující faktor (tumor necrosis factor)
TPA	tkáňový polypeptidový antigen (tissue polypeptide antigen)
TPS	tkáňový polypeptidový specifický antigen (tissue polypeptide specific antigen)
u-PA	urokináza
ZN	zhoubný nádor
β_2 M	beta2-mikroglobulin

7 Seznam literatury

Ajmová, J., *Aktuální informace-zhoubný novotvar prsu (rok 2002 předběžná data)* [on-line]. 21. 7. 2004 [citováno 14. dubna 2009]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/download.php?ctg=20&search_name=novotvar®ion=100&kind=21&mnu_id=6200>.

Barak, V., Goike, H., Panaretakis, K. W. et al., *Clinical utility of cytokeratins as tumor markers*. CLINICAL BIOCHEMISTRY, 37: 529-540, 2004.

Bartůňková, J., Paulík, M. et al., *Vyšetřovací metody v imunologii*. 1. vyd. Praha: Grada, 2005. 176 s.

Čihák, R., *Anatomie 3*. 1. vyd. Praha: Grada, 1997. 655 s.

Duffy, M. J., *CA 15-3 and related mucins as circulating markers in breast cancer*. CLINICAL BIOCHEMISTRY, 36: 579-586, 1999.

Duffy, M. J., *Serum tumor markers in breast cancer: Are they of clinical value?* CLINICAL CHEMISTRY, 52: 345-351, 2006.

Giacinti, L., Claudio, P. P., Lopez, M., Giordano, A., *Epigenetic information and estrogen receptor alpha expression in breast cancer* [on-line]. 11. 10. 2005 [citováno 12. dubna 2009]. Dostupné z: <<http://intl-theoncologist.alphamedpress.org/cgi/content/full/11/1/1>>.

Hammarström, S., *The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues*. CANCER BIOLOGY, 9: 67-81, 1999.

Harris, L., Fritsche, H., Mennel, R. et al., *American society of clinical oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer*. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, 25: 5287-5312, 2007.

Internet 1: <<http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni--tumorove-markery>> [citováno 27. ledna 2009].

Internet 2: <<http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text11.htm>> [citováno 27. března 2009].

Internet 3: <www.lf2.cuni.cz/Ustavy/biochemie/vyuka/Fluorescence.ppt> [citováno 16. února 2009].

Internet 4: <http://www.ropacek.cz/o_j/index-1.html> [citováno 16. února 2008].

Internet 5: <http://okbh.centromed.cz/texty/tm_new/CEA.htm> [citováno 17. listopadu 2008].

Internet 6: <http://okbh.centromed.cz/texty/tm_new/CA15_3.htm> [citováno 17. listopadu 2008].

Internet 7: <http://okbh.centromed.cz/texty/tm_new/CA125.htm> [citováno 17. listopadu 2008].

Internet 8: <<http://www.ordinace.cz/laboratorni-hodnoty/40/>> [citováno 28. března 2009].

Internet 9: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/MsAAJ.htm> [citováno 3. dubna 2009].

Internet 10: <public.fnol.cz/www/okb/Inf/info_okb/2004/5_2004.doc> [citováno 4. dubna 2009].

Internet 11: <https://www.zdravcentra.cz/index.php?act=k-10&did=1035&page=kapitoly%2Fspecialni_cast%2Fnadorove_onemocneni%2F10_5.htm> [citováno 4. dubna 2009].

Internet 12: <www.mou.cz/mou/upload/jednotl.html> [citováno 13. dubna 2009].

Internet 13: <http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/TM/TM_dopor.pdf> [citováno 13. dubna 2009].

Internet 14: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/MZADY.htm> [citováno 14. dubna 2009].

Internet 15: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/MsAAW.htm> [citováno 14. dubna 2009].

Jílek, P., Buchta, V. et al., *Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví*. 1.vyd. Praha: Karolinum, 2002. 104 s.

- Klener, P., *Klinická onkologie*. Praha: Galén, 2002. 686 s.
- Klener, P., Malbohan, I. M., Zima, T.: Nádorové markery. In *Laboratorní diagnostika* (Zima, T., ed.) 331-340. 1. vyd. Praha: Galén, 2002.
- Konrádová, V., Uhlík, J., Vajner, L., *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H&H, 2000. 291 s.
- Koutecký, J. a kol., *Klinická okologie*. 1. vyd. Praha: Avicenum, 1989. 320 s.
- Leonard, G. D., Low, J. A., Berman, A. W., Swain, S. M., *CA 125 elevation in breast cancer: A case report and review of the literature*. THE BREAST JOURNAL, 10: 146-149, 2004.
- Lüftner, D., Lüke, C., Possinger, K., *Serum HER-2/neu in the management of breast cancer patients*. CLINICAL BIOCHEMISTRY, 36: 233-240, 2003.
- Mačák, J., Mačáková, J. *Patologie*. Praha: Grada, 2004. 347 s.
- Masopust, J. *Nádorové markery včera, dnes a zítra (3. část)* [on-line]. 04. 2004 [citováno 12. dubna 2009]. Dostupné z: <<http://www.roche-diagnostics.cz/download/la/0404/markery.pdf>>.
- Murray, R.,K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W., *Harperova biochemie*. 2. české vyd. Jinočany: H&H, 1998. 872 s.
- Nekulová, M.: Laboratorní známky zhoubného novotvaru. In *Klinická biochemie* (Racek, J. ed.) 247-257. 2.vyd. Praha: Galén, 2006.
- Pecka, M. *Laboratorní hematologie v přehledu. Fyziologie a patologie hemostázy*. Český Těšín: Finidr, 2004. 237 s.
- Povýšil, C. a kol.. *Speciální patologie II. díl*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. 151 s.
- Rustin, G., Bast, R., Kelloff, G., *Use of CA-125 in clinical trial evaluation of new therapeutic drugs for ovarian cancer*. CLINICAL CANCER RESEARCH, 10: 3919-3926, 2004.
- Sawant, S. S., Zingde, S. M., Vaidya M. M., *Cytokerain fragments in the serum: Their utility for the management of oral cancer*. ORAL ONCOLOGY, 44: 722-732, 2007.