

**UNIVERZITA KARLOVA
FAKULTA FARMACEUTICKÁ**

Katedra biologických a lékařských věd



Současný stav v diagnostice nádorových markerů
(bakalářská práce)

Vedoucí bakalářské práce : Prim. MUDr. František Langr (FN)

Vedoucí katedry : Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc

Hradec Králové, květen 2006

Kateřina Kotlabová

Děkuji prim.MUDr. Františkovi Langrovi za odborné vedení a poskytnutí informací a studijních materiálů, jež jsem využila při sestavování bakalářské práce.

Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému tímto děkuji za pomoc při vyhledávání literárních pramenů a při zpracování obrazové dokumentace.

Prohlašuji, že jsem na této bakalářské práci pracovala samostatně, a že jsem použila jen uvedenou literaturu.

Kolářová

O B S A H

strana

SOUHRN	5
1. ÚVOD	6
2. NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ A JEJICH LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA	8
2.1. Historie oboru	9
2.2. Obecná charakteristika nádorového růstu	11
2.2.1. Patogeneze vzniku zhoubných nádorů	11
2.2.2. Vlastnosti nádorových buněk	14
2.3. Metody užívané v laboratorní diagnostice nádorových onemocnění	16
2.3.1. Vyšetření karyotypu	16
2.3.2. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) a její modifikace multicolor FISH a SKY	17
2.3.3. Srovnávací genová hybridizace	18
2.3.4. PCR (polymerázová řetězová reakce) a její modifikace	18
2.3.5. Technika tkáňové mikroarray	19
2.3.6. Cytometrická DNA-analýza	20
2.3.7. Imunochemické metody stanovení nádorových markerů	20
2.3.8. Imunohistochemické metody stanovení nádorových markerů	25
3. NÁDOROVÝ MARKER	31
3.1. Obecná charakteristika nádorových markerů	32
3.1.1. Ideální nádorový marker	32
3.1.2. Oblasti užití nádorových markerů	34
3.1.3. Základní přehled tumorových markerů	35
3.2. Charakteristika jednotlivých tumorových markerů a jejich význam	36

3.2.1. Onkofetální antigeny	36
3.2.2. Onkoplacentární antigeny	43
3.2.3. Proliferační tumorové markery	45
3.2.4. Paraproteiny	45
3.2.5. Hormony	45
3.2.6. Enzymy	47
3.2.7. Sérové proteiny	49
3.2.8. Buněčné tumorové markery	50
3.2.9. Některé další ukazatele zhoubného nádoru	52
3.2.10. Perspektivní nádorové markery	54
4. PSA A JEHO VYUŽITÍ V DIAGNOSTICE ONEMOCNĚNÍ PROSTATY ...	56
4.1. Obecná charakteristika PSA	57
4.1.1. Struktura a výskyt PSA	57
4.1.2. Faktory ovlivňující hodnoty sérové koncentrace PSA	58
4.2. PSA a karcinom prostaty	58
4.2.1. PSA screening	58
4.2.2. PSA a detekce karcinomu prostaty	
Rozlišení karcinomu prostaty a benigní hyperplazi prostaty	61
4.2.3. RT – polymerázová řetězová reakce PSA (RT-PCR PSA)	66
4.3. Budoucnost v diagnostice karcinomu prostaty	67
5. HISTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ V DIAGNOSTICE	
KARCINOMU PROSTATY	69
5.1. Materiál pro vyšetření	70
5.2. Stanovení stagingu a gradingu	70
5.2.1. Staging	70
5.2.2. Grading	72
5.3. Detekce bazálních buněk	72

5.4. Histologická analýza	73
6. DISKUZE	81
7. ZÁVĚR	84
8. SEZNAM LITERATURY	86

S O U H R N

Incidence nádorových onemocnění vykazuje v posledních desetiletích výrazně stoupající charakter. Proto je tato bakalářská práce zaměřena na popis charakteristických vlastností nádorově zvrhlé buňky, které mohou být využívány v diagnostice a sledování průběhu terapie maligních onemocnění.

Ukazatele přítomnosti zhoubného novotvaru v organismu, jež je možno stanovit laboratorními metodami v tělních tekutinách či vzorcích tkání, jsou označovány jako nádorové (tumorové) markery. Ke stanovení přítomnosti, resp. koncentrace těchto látek ve vyšetřovaném materiálu je využívána nejen řada klasických biochemických a histologických metod, ale i moderní postupy vycházející z poznatků molekulární biologie.

Náplní této práce je zejména přehledný výčet používaných laboratorních metod a nejčastěji stanovovaných nádorových markerů i s jejich stručnou charakteristikou.

Zvýšená pozornost je věnována klinickému využití stanovení specifického prostatického antigenu (PSA) a z jeho hodnoty odvozených parametrů v diagnostice karcinomu prostaty. K učení stádia a prognózy karcinomu prostaty je rovněž využíváno hodnocení histologických preparátů a stanovení přítomnosti bazálních buněk s použitím monoklonálních protilátek proti vysokomolekulárním cytokeratinům, proteinům intermediálních filament epiteliálních bazálních buněk.

1. ÚVOD

Nádorové markery jsou již řadu let středem pozornosti při diagnostice, léčbě a dlouhodobém sledování nemocných s maligním onemocněním. Jsou to látky, které často vznikají v organismu v souvislosti se změněným metabolismem nádorově transformované buňky, a proto jejich hladiny v přítomnosti malignity výrazně stoupají. Od látek produkovaných normálními buňkami se liší, buď kvalitativně (nádorově specifické markery) či kvantitativně (s nádorem asociované markery), přičemž tyto charakteristické vlastnosti jsou využívány k laboratornímu stanovení jejich koncentrace v různých druzích biologického materiálu (krevní sérum, bioptický materiál apod.). Nalézáme je jak uvnitř nádorových buněk, tak na jejich povrchu. Lze je prokázat histologicky přímo v nádorové tkáni (celulární nádorové markery), nebo v tělních tekutinách (humorální nádorové markery).

Nádorové markery umožňují v současné době zcela nové přístupy v léčbě onkologicky nemocných pacientů. Mohou sloužit k rozlišení mezi benigním a maligním nádorem, k určení stadia onemocnění a především jsou vhodné pro včasný záchyt recidivy onemocnění. Proto indikované použití vhodného markeru může rozhodujícím způsobem přispět k výsledku léčby a tím zlepšit dobu přežití nemocného.

**2. NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ A JEJICH
LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA**

2.1. Historie oboru

Rakovina, správněji nádorové onemocnění, je stará jako život sám; může se v určité formě objevit u všech vícebuněčných organismů (živočichů i rostlin). Byly nalezeny známky proběhlých nádorů lebky u pravěkých lidí nebo nádorů prsu u egyptských mumií 5000 let starých. Antické Řecko v osobě lékaře Hippokrata jí dalo dokonce jméno „CANCER“.

Laboratorní průkaz nádorových onemocnění se objevuje v odborné literatuře už od poloviny 19. století, kdy ve střední Evropě začal vznikat obor klinické chemie. V té době nebyla ještě k dispozici laboratorní technika, takže testy spočívaly na jednoduchých fyzikálně chemických reakcích.

Jako příklad můžeme uvést průkaz krystalků kyseliny močové, které se vytvoří na bavlněném vláknu ponořeném jedním koncem do séra pacienta ve fázi tumorolýzy (např. při náhlém rozpadu blastů u chronické myeloidní leukémie).

Dalším markerem pocházejícím z této doby je průkaz tzv. Bence Jonesovy bílkoviny (Henry Bence Jones, 1845) v moči při zkoušce varem, kdy tato bílkovina začíná precipitovat při teplotě blízké 80°C a znovu se rozpouští při 90°C. Podstata této reakce nebyla tehdy vůbec známa, ale průkaz a stanovení tohoto proteinu (monoklonální lehké řetězce imunoglobulinů) citlivými a specifickými metodami patří mezi důležité testy v diferenciální diagnostice monoklonálních gamapatií.

Od počátku druhé poloviny 20. století nastává skutečný rozmach studia vyšetřování tumorových markerů.

U nás byla v té době velmi populární Brdičkova polarografická reakce; i když původně to měl být test na „rakovinu“, už Brdička sám upozorňoval, že může být pozitivní i u nenádorových onemocnění (záněty, žaludeční vřed, infarkt myokardu atd.).

Jak píše Homolka ve své „Klinické biochemii“ z roku 1969 : Pozitivita Brdičkovy reakce u pacienta v klidovém stavu, bez teplot a s negativním klinickým nálezem nás bude vždy nutit, abychom mysleli na skrytý chorobný proces a eventuálně nádor; negativita reakce však nebude takovýto proces vylučovat.

Přibližně ve stejné době byl navržen Sáblíkem komplex biochemických a hemaologických testů (dvě desítky nespecifických běžných vyšetření) jako screening nádorových onemocnění. Komplexní test však pro svoji nákladnost a malou výtěžnost nenašel širší uplatnění.

Výzkumem tzv. nádorových antigenů tj. látek, kterými se liší nádorová buňka od buňky nebo tkáně zdravé, nastal přelom a „nastartování“ rozvoje vyšetřování tumorových markerů (Tab. 1)(8).

Tab. 1 Data objevů nejznámějších nádorových markerů (8)

rok objevení markeru	autor	nádorový marker
1928	Ascheim, Zondek	hCG (lidský choriový gonadotropin)
1936	Gutman	PAP (kyselá prostatická fosfatáza)
1957	Bjorklund	TPA (tkáňový polypeptidický antigen)
1963	Abelev	AFP (alfa-1-fetoprotein)
1965	Gold	CEA (karcinoembryonální antigen)
1974		Malignin
1979	Koprowski	CA 19-9 (CA = carbohydrate antigen)
1979	Wang	PSA (prostatiský specifický antigen)
1981	Best	CA 125
1983	Kufe	CA 15-3
1984		SCC (SCCA) (antigen skvanózních buněk)

S dalším vývojem diagnostických a laboratorních technik se ukázalo, že ideální princip nádorového antigenu „značícího“ výhradně nádorovou buňku je jen těžko splnitelný, protože malé množství takovýchto antigenů, i když řádově odlišné, tvoří i buňky zdravé nebo nenádorové.

Z tohoto důvodu má využití tumorových markerů pro diagnostiku obecně menší význam (i když v některých případech mohou tumorové markery k diagnostickému procesu

příspěť); svou vazbou k malignímu (zhoubnému) procesu však značně napomáhají klinické detekci (screeningu), monitorování a hodnocení vývoje maligního onemocnění.

2.2. Obecná charakteristika nádorového růstu

Nádor je jedna ze základních patologických změn organismu představovaná charakteristickým proliferačním stavem tkáně a tkáňovými diferenciačními odchylkami podmíněnými změnou genotypu somatické buňky. Nádorová choroba je komplexní odpověď organismu na růst nádoru. Vývoj nádoru a tím daný i rozvoj nádorové choroby je extrémně dlouhý a probíhá většinu doby subklinicky, při zdánlivém plném zdraví jeho nositele. Vlastní manifestní onemocnění zjistitelné a sledovatelné dnešními klinickými metodami činí pouze 10-20% doby existence nádoru v organismu.

2.2.1. Patogeneze vzniku zhoubných nádorů

Maligní transformace buňky a vývoj nádoru bez ohledu na jeho příčinu probíhají i přes zdánlivou plynulost stupňovitě a jsou velmi dlouhodobé. Celý proces malignizace normální tkáně – vznik definitivního nádoru – je dán postupnými změnami genotypu a s nimi korespondujícími změnami transformované buněčné populace (Tab.2).

Podle sumárních fenotypických projevů všech buněk nádoru v daném okamžiku maligního procesu pak můžeme celý dlouhodobý vývoj vzniku nádoru obecně a schematicky rozdělit do tří fází :

I. Fáze indukční

Z patogenetického hlediska lze tuto fázi rozdělit na další tři vývojové etapy :

a) Etapa iniciace

V tomto období se jedná o změnu genotypu buňky nebo vzácně i skupiny buněk, která se stává trvalou, ireverzibilní. Alterace genotypu bývá nejčastěji podmíněna mutací; změněná buňka bývá označována jako vzbuzeaná, iniciovaná. Tato iniciace je vyvolána celou řadou transformujících onkogenních faktorů a dochází k ní většinou bezprostředně nebo velmi brzy po začátku jejich působení. Po iniciační mutaci dochází však ve většině případů k opravě

vzniklé chyby vlastními silami genomu, nebo často je postižená buňka natolik poškozená, že spontánně zaniká.

b) Etapa latence

Je individuálně dlouhá a představuje časový úsek, ve kterém může pokračovat působení iniciátoru, ve kterém může docházet k opakované eliminaci vzbuzených buněk silami organismu a pravidelně v něm dochází k počátku pozitivní fenotypické selekce změněných iniciovaných buněk.

c) Etapa promoce

Obvykle vyžaduje dosti dlouhý účinek promočního faktoru – promotoru, kterým může být karcinogenní látka (vzácně identická s iniciátorem), hormonální dráždění nebo působení růstových faktorů, dále i fyzikální iritace vedoucí k výrazné proliferaci, ale i onkogenní virus. Promotor je tedy nejčastěji látka, která bez předchozí iniciace sama nádorovou přeměnu neindukuje, působí však zvýšení proliferační aktivity buňky a tím zvyšuje pravděpodobnost fixace genetické chyby. Rozvíjí se tak vhodné podmínky pro vznik dalších genomových změn v celém iniciovaném buněčném klonu. Při pokračující proliferaci dochází i k fenotypickým změnám buňky, které se projevují morfologickým prohlubováním dysplazie s narůstající tkáňovou i buněčnou atypií.

Celá indukční fáze se všemi jmenovanými etapami má velmi dlouhý průběh udávaný na 15 až 30 let.

II. Fáze „blastoma in situ“

Patří z hlediska patologické morfologie ještě do období preneoplastického a trvá 5 až 10 let. Z hlediska buněčného a tkáňového zde dochází k postupné selekci atypických buněk s již plnou genotypickou charakteristikou maligního nádoru, ale ještě s neúplně funkčně vyjádřeným maligním fenotypem; chybí zejména schopnost invazivního růstu a metastatické diseminace.

III. Fáze progresu nádoru

Tuto etapu můžeme rozdělit do dvou částí, které nemusí být vyjádřeny u všech nádorů a přesný moment jejich přechodu neznáme.

a) Etapa invaze

Má obvykle délku 1 až 3 roky a je charakterizována lokálním infiltrativním nebo destruktivním růstem bez diseminace.

b) Etapa diseminace

Je charakteristická metastatickým rozsevem nádorových buněk (11).

Tab. 2 Schéma mnohastupňového vývoje maligního nádoru (11)

Fenotyp buněk	Etapa	Fáze (délka v letech)
normální somatický ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○		normální buňka
Nejčastěji mutační genetická změna ○ ○ ještě normální ○ ⊛ ○ ○ ○ ○ Další – nejčastěji mutační genetické změny □ ○	iniciace latence	indukce (15 – 30)
pre maligní – atypický ○ □ □ ○ ○ ○ Opět genetické změny + klonální selekce	promoce	
expanze pre maligního atypického klonu □ □ □ □		
Mnohotné mutační a další genetické změny + klonální selekce * □ expanze invazivního maligního klonu * □ * □ * □ Mutační genetické změny + klonální selekce * *	invaze rozsev	progrese (1 – 5)
expanze metastatických klonů * □ * * * *		
nádor v letální velikosti s regionálními i systémovými metastázami		

2.2.2. Vlastnosti nádorové buňky

Rozdíl v dynamice růstu normálních a transformovaných tkání je v tom, že v normální tkáni existuje rovnováha mezi produkcí a zánikem buněk, kdežto v nádorové přesahuje množství vzniklých buněk počet odumírajících a z růstu vyřazených. Celkový počet buněk v nádoru a tím částečně daná jeho velikost, jsou ovlivněny jednak proliferační aktivitou buněk a jednak jejich prodlouženým přežíváním.

Vlastnosti nádorové buňky

Všechny somatické buňky mají identický genom, který je vyjádřen ve fenotypických znacích každé buňky. Změny genotypu vzniklé na úrovni somatických buněk při maligní transformaci s následujícími odpovídajícími fenotypovými projevy mají některé společné obecnější znaky, kterými se pak liší nádorová buňka od výchozí buňky somatické v kterémkoliv jejím diferenciacním stádiu.

Část těchto odlišností lze detekovat pouze obtížně laboratorně v prostředí *in vitro* po explantaci nádoru do tkáňové nebo buněčné kultury. Další část je zřejmá ze vztahu nádoru a hostitele přímým pozorováním a je potom prokazatelná přímo *in vivo*, nebo na čerstvě odebraných tělesných tekutinách nebo nakultivovaných buňkách – tzv. *ex vivo*.

a) Vlastnosti detekovatelné po explantaci buňky *in vitro*

1) Nesmrtelnost nádorové buňky

Nádorové buňky se transformací stávají jako populace relativně nesmrtelnými a s použitím odpovídajících technických postupů a při poskytnutí vhodného prostředí mohou žít bez časové limitace (jako příklad modelových nesmrtelných nádorových buněk mohou sloužit HeLa buňky derivované ve 40. letech z lidského karcinomu čípku a kultivované v laboratořích v permanentní linii dosud). Tato transformací získaná vlastnost je dána změnami v systému telomeráz a v telomerech autozomů.

2) Snížení závislosti na metabolických podnětech okolí

Nádorová buňka ztrácí potřebu přítomnosti komplexních bílkovinných růstových faktorů a trofických hormonů ve svém prostředí a je schopna růst pouze se základními jednoduchými živinami. Tato vlastnost se projeví v tkáňové kultuře sníženým nárokem permanentních maligních linií na přítomnost sérových nedefinovaných složek kultivačního média – jejich koncentraci je možno výrazně snižovat. Podstatou je pravděpodobně schopnost nádorové buňky produkovat působky autokrinního i parakrinního typu ovlivňující růst.

3) Změna závislosti růstu na podložce

Netransformované somatické buňky jsou svým růstem v prostředí *in vitro* silně závislé na vazbě na vhodný povrch; dispergovány v tekutých nebo polotuhých médiích bez kontaktu s pevným povrchem sice metabolizují, ale nejsou schopny růstu.

Transformované buňky nejsou svým růstem tak výrazně závislé na pevném povrchu a vytváří dobře rostoucí kolonie i v polotuhém agarovém nebo kolagenovém médiu.

4) Ztráta kontaktní inhibice

Kontaktní inhibice je fenomén, díky němuž, pokud dojde při libovolném druhu pohybu k vzájemnému dotyku stejných netransformovaných somatických buněk, je zastavena jejich aktivita ve směru dotyku a další pohyb – tedy i dělení – pokračuje pouze volným směrem. Při úplném obsazení kultivačního povrchu přestává potom buněčný pohyb i dělení.

U nádorových buněk dochází k různému stupni snížení až ztrátě kontaktní inhibice a transformovaná buňka je schopna růst i ve směru další buňky a přes další buňku, takže jsou vytvářeny vícevrstevné formace.

b) Vlastnosti patrné a detekovatelné *in vivo* a *ex vivo*

1) Změny karyotypické

Jsou dány většinou nestabilitou nádorového genomu a vyznačují se takřka pravidelně zvýšeným množstvím DNA i zvýšeným počtem chromozomů ve smyslu polyploidie.; dalším častým znakem je aneuploidie. Velmi často se vyskytují tečkovité chromozomy a

chromozomální odchylky, jako jsou některé translokace, delecce, zlomy a další abnormality identifikovatelné proužkovacími a novějšími metodami moderní cytogenetiky.

2) Změny buněčných povrchů

Týkají se povrchových glykolipidů a glykoproteinů cytoplazmatické membrány a podmiňují např. snadnější aglutinaci buněk protilátkami i lektiny při histochemických reakcích a biochemických diagnostických testech.

3) Antigenní změny nádorové buňky

Většina buněk nádorů je charakterizována snížením sumárního množství přirozených antigenů všech typů a velmi často vznikem tzv. neoantigenů specifických pro nádorovou buňku. Tyto nové antigeny jsou částečně závislé a částečně nezávislé na transformujícím agens a část z nich je při odpovídající imunizaci schopna standardně vyvolat proti sobě dobře detekovatelnou imunitní reakci. Z hlediska specifity mohou být neoantigeny nádorové buňky individuálně specifické (odpovídají pouze určitému typu nádoru), nebo jsou sdíleny více nádory.

Obecně byly neoantigeny rozděleny na nádorově specifické antigeny (TSA), jejichž přítomnost je prokazována výlučně na nádorových buňkách, a s nádorem spojené (asociované) antigeny (TAA), které se vyskytují na nádorových buňkách, ale za jistých okolností jsou prokazatelné i na některých netransformovaných buňkách (11).

2.3. Metody užívané v laboratorní diagnostice nádorových onemocnění

2.3.1 Vyšetření karyotypu

Cytogenetické vyšetření umožňuje prokázat numerické (zmnožení počtu chromozomů nebo jejich chybění) a hrubší strukturní aberace na základě morfologické změny chromozomů v mitóze. Hlavní výhodou tohoto základního vyšetření je v tom, že na rozdíl od většiny molekulárně biologických metod je schopno detekovat širokou škálu

chromozomálních změn. Hlavními nedostatky jsou menší citlivost v detekci změn (neprokáže malé delece nebo translokace malých částí chromozomů) a relativně častá neúspěšnost vyšetření. I nejrenomovanější pracoviště dosahují pouze 40-60% úspěšnosti cytogenetického vyšetření solidních nádorů, u non-Hodgkinských lymfomů a zvláště u akutních leukémií je úspěšnost podstatně vyšší.

V nádorové diagnostice je nutné vyšetřit přímo tkáň nádoru, ať již primárního, nebo metastázy, eventuálně infiltrovanou kostní dřeň, periferní krev při vyplavování nádorových buněk, či výpotek, pokud obsahuje nádorové buňky. Situaci komplikuje obtížnost kultivace nádorových buněk a to, že mnohdy v kultuře přerostou nenádorové buňky. Proto je nález normálního karyotypu nutné hodnotit vždy opatrně. I v době molekulárně genetických metod zůstává cytogenetické vyšetření stále základní metodou ke sledování změn chromozomů a genů (4).

2.3.2 Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) a její modifikace multicolor FISH a SKY

Tyto metody jsou založeny na vazbě (hybridizaci) fluorescenčně značené sondy nebo více sond značených různými fluorochromy k DNA, eventuálně RNA, přítomné ve vzorku buněk fixovaných na podložním sklíčku a jejich detekci fluorescenčním mikroskopem. Sondy jsou různého typu :

1. centrometrické sondy
2. sondy, které hybridizují se specifickými sekvencemi
3. „malovací“ (painting) sondy

FISH lze aplikovat na různé materiály : nátěry kostní dřeně nebo periferní krve, histologické řezy, suspenze připravené ze solidních tkání, buňky z výpotků, mozkomíšního moku či buněčných kultur i na chromozomové preparáty. V současnosti jsou známé postupy, které umožní vyšetřit i interfazické buňky z archivní, do parafínu zalité tkáně.

Hlavním využitím FISH je průkaz numerických odchylek chromozomů nebo jejich částí, detekce amplifikací nebo delecí genů a při použití dvou různě značených sond lze prokazovat i translokace. Hlavní výhodou interfazické FISH je možnost vyšetření materiálu i

tam, kde nelze získat hodnotitelné mitózy, což je u solidních nádorů poměrně časté. Navíc mitotická FISH umožňuje hodnotit preparáty s nedostatečně protaženými chromozomy, které by nebylo možné identifikovat morfologicky pruhovacími metodami.

Rozvoj přípravy nových fluorochromů umožňuje vícebarevnou FISH, kterou lze hodnotit více chromozomů najednou. Tato metodika je zvláště vhodná pro posuzování komplexních translokací. V současnosti byla vyvinuta metoda SKY (zkratka ze spectral karyotyping), která umožňuje barevnou identifikaci všech lidských chromozomů. Podstatou je užití dvaceti čtyř malovacích sond proti všem autozomům a chromozomům X a Y (4).

2.3.3. Srovnávací genová hybridizace **(CGH - „Comparative Genomic Hybridization“)**

Jde o modifikaci FISH, kdy normální a studovaná DNA jsou každá označena jiným fluorochromem a pak jsou současně hybridizovány na normální lidské chromozomy v metafázi. Fluorescence se snímá kamerou a vyhodnocuje počítačem. Poměr intenzit fluorescence podél jednotlivých chromozomů určí místa s chyběním nebo nadbytkem DNA v příslušné oblasti. Tato metoda je tedy ideální pro zjišťování chybění nebo zmnožení chromozomů či jejich částí, nelze ji však využít k detekci balancovaných translokací, protože u nich není zvýšené ani snížené množství DNA, ale je „přehozené pořadí“ některých chromozomů. Výhodou je, že k vyšetření se používá izolovaná DNA, a není proto nutné získat dělící se buňky. Izolaci DNA lze provádět i z archivního, do parafínu zalitého materiálu (4).

2.3.4. PCR (polymerázová řetězová reakce) a její modifikace

Umožňuje mnohonásobné pomnožení (teoreticky 2^n , kdy n je počet cyklů, který se zpravidla pohybuje mezi 15-40) specifických úseků zkoumané DNA o velikosti několika stovek až tisíců bází. Takto získaný produkt PCR lze prokázat elektroforézou, eventuálně doplněnou blotováním a hybridizací na membráně. Zvýšenou citlivost lze dosáhnout použitím primerů značených izotopy nebo fluorescenčně. Podstatou této reakce je opakovaná enzymatická syntéza DNA v cyklické reakci o třech fázích.

Jako vzorek lze také použít cDNA připravenou z RNA reverzní transkripcí, pak mluvíme o reverzně transkripční PCR = RT PCR.

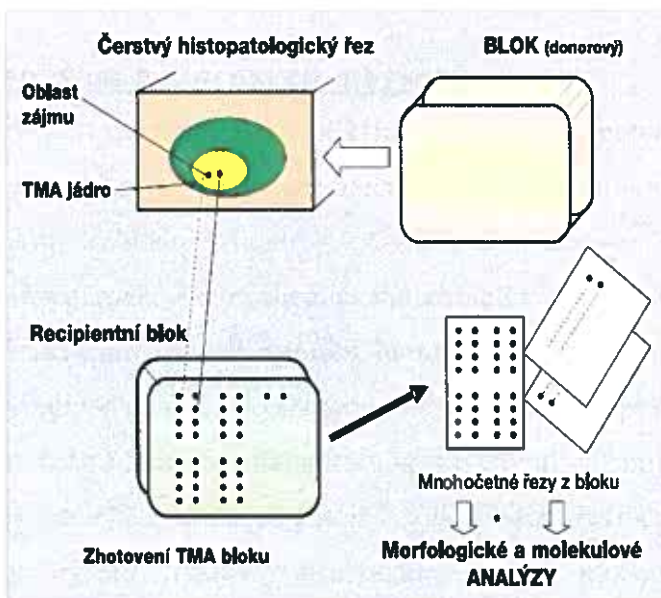
V onkologii lze využít PCR a RT PCR k detekci specifických translokací a RT PCR umožňuje průkaz specifické mRNA. Citlivost těchto metod je vysoká – PCR umožňuje prokázat jednu nádorovou buňku na 10^3 - 10^4 buněk zdravých a RT PCR je ještě o 1 až 2 řády citlivější. Citlivost a specifitu lze ještě zvýšit takzvanou „nested“ PCR - podstatou je použití dvou PCR.

V současné době se zavádí nová metoda PCR v reálném čase, která umožňuje kvantitativní měření. PCR probíhá ve zvláštním cyklu - „light cycler“, který umožňuje měřit fluorescenci v průběhu reakce po každém cyklu, přičemž jsou použity primery s navázanými fluorochromy, které emitují světlo pouze, pokud jsou navázány do produktu reakce (1).

2.3.5. Technika tkáňové mikroarray (TMA – „Tissue Microarray“)

Jde o jednu z nejmodernějších metod, v níž se spojuje tradiční histopatologie s technikou molekulární biologie.

Spočívá ve vyříznutí válečků z běžných histopatologických bloků v místech, určených pro zkoumání (blok donorový); tyto válečky tkáně se zalijí do nového parafínového, tzv. recipientního bloku (Obr. 1). Do tohoto bloku se postupně vkládají další a další vzorky (z různých míst téhož tumoru nebo ze vzorků odebraných z různých období choroby nebo z nádorů od mnoha dalších pacientů).



Obr. 1 Schéma techniky tkáňové mikroarray (TMA)

Tím se získá recipientní blok se stovkami různých vzorků, z něhož jsou připraveny tisíce řezů, které se pak testují imunohistochemicky na přítomnost nebo nepřítomnost různých antigenů nebo se využívají pro molekulárně biologické vyšetření.

Vyšetření pomocí „mikroarray technologie“ poskytuje možnost získat informace o patologii nemoci, o její progresi, o rezistenci na terapii nebo odpovědi buněčného mikroprostředí, což nakonec umožní včasnou a správnou diagnózu a tím i správný přístup k terapii pro každého konkrétního pacienta (8).

2.3.6. Cytometrická DNA-analýza

Její podstatou je měření celkového obsahu DNA v buňkách na základě vazby fluorescenčního barviva na DNA a kvantitativní měření fluorescence průtokovým cytometrem. Klinicky významným údajem je takzvaná DNA-ploidie, která informuje o změněném obsahu DNA ve sledovaných buňkách. Měření obsahu buněčné DNA je vztaženo ke známému diploidnímu standardu a jeho výsledky jsou hodnoceny jako „DNA-diploidní“, „DNA-aneuploidní“, „DNA-tetraploidní“ apod. V literatuře se objevuje celá řada údajů o vztahu mezi aneuploidii či parametry kinetiky buněčného cyklu nádorových buněk a prognózou řady zhoubných nádorů (4).

2.3.7. Imunochemické metody stanovení nádorových markerů

Pro vyšetření koncentrace nádorových markerů jsou obvykle používány metody imunochemické analýzy. Principem těchto reakcí je vazba mezi antigenem (nádorovým markerem) a k němu specifickou protilátkou. Základní principy spočívají buď v homogenní, nebo heterogenní imunoanalýze; detekci vytvořeného imunochemického komplexu umožňuje značení např. enzymem, radionuklidem, fluorescenčním indikátorem, luminoforem.

Koncentrace markerů v séru se pohybují ve velice nízkých hodnotách ($\mu\text{g/l}$, ng/l), proto je výběr optimální metody stanovení ovlivněn především parametry spolehlivosti vlastního metodického postupu (přesnost, správnost, detekční limit, použitelné koncentrační rozmezí, specifita protilátek). K dalším kritériím výběru metody a analyzátoru se řadí možnost automatizace, nutné přístrojové vybavení, stabilita reagensů, možnost co nejjednodušší kalibrace (při opakované kalibraci téže šarže možnost použít pouze jednu koncentraci z kalibrační křivky), časová a technická náročnost, finanční náklady na vyšetření.

Běžně se používají imunochemické automatické analyzátory, které umožňují stanovení po pacientech a které mají velký výkon – např. až 200 stanovení za hodinu. Miniaturizace imunochemických technologií umožňuje minimalizovat spotřebu séra i reagensů.

Na jednom typu automatického analyzátoru lze používat obvykle diagnostické soupravy pouze od jednoho výrobce. Dlouhodobé sledování vyžaduje nestřídat soupravy od různých výrobců pro jeden marker, na druhé straně pro různé markery je možno brát soupravy od různých výrobců (2).

K nejrozšířenějším typům imunometrických stanovení patří metody EIA (ELISA, EMIT), FPIA, FIA, CLIA, RIA, IRMA, CEDIA, MEIA a chemiluminiscence, jejichž stručná charakteristika následuje :

I. Metody enzymoimunoanalýzy (EIA - „Enzyme Immunoassay“)

K detekci vznikajícího imunokomplexu je využívána barevná reakce enzymu se specifickým substrátem; po ukončené enzymové reakci se měří absorbance barevného produktu.

Pro značení antigenů se používají různé enzymy – nejčastěji křenuvová peroxidasa, alkalická fosfatasa, glukosaoxidasa, beta-galaktosidasa apod.

Pro imunoreagencie značené alkalickou fosfatasou se jako substrát používá p-nitrofenylfosfát, pro peroxidasu peroxid vodíku, přičemž uvolněný kyslík při enzymové reakci oxiduje bezbarvý chromogen (o-fenylendiamin) na barevný produkt (žlutooranžové zbarvení).

Metody enzymové imunoanalýzy dělíme na metody kompetitivní (soutěživé), do kterých patří homogenní technika EMIT a heterogenní technika ELISA. Druhou skupinu tvoří metody nekompetitivní (nesoutěživé), označované jako sendvičové testy ELISA.

A) Kompetitivní enzymoimunoanalýza

Stanovovaný antigen (tumorový marker) přítomný v analyzovaném vzorku (Ag) a antigen značený enzymem (Ag^E) soutěží o vazebná místa na specifické protilátce přidané v limitovaném množství. Po proběhlé inkubační reakci budou přítomny v reakční směsi

imunokomplexy Ag-Ab a $Ag^E - Ab$ i volný nezreagovaný Ag a Ag^E . Oba značené produkty dávají specifickou reakci se substrátem. Můžeme měřit :

- 1) enzymovou aktivitu nezreagovaného Ag^E (u techniky homogenní enzymoimunoanalýzy - EMIT) – koncentrace tumorového markeru je přímo úměrná absorbanci
- 2) enzymovou aktivitu imunokomplexu $Ag^E - Ab$ (u techniky heterogenní enzymoimunoanalýzy – ELISA) – koncentrace tumorového markeru je nepřímo úměrná absorbanci

B) Nekompetitivní enzymoimunoanalýza

Tuto skupinu tvoří nesoutěživé metody, které pracují s nadbytkem protilátky; jsou obvykle založené na sendvičovém principu.

1) sendvičový test ELISA

Protilátka je navázána v přebytku na pevnou fázi, kterou je obvykle vnitřní stěna umělohmotné zkumavky např. z polystyrenu nebo stěny mikrotitrační destičky. Po přidání vzorku dojde k navázání stanovovaného antigenu; balasty jsou odstraněny promytím. Dalším krokem reakce je vazba specifické protilátky značené enzymem; po promytí se přidá substrát a po inkubaci se měří enzymová aktivita značeného imunokomplexu, naměřená absorbance je přímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu.

2) nekompetitivní enzymoimunoanalýza na mikročasticích (MEIA)

Pevnou fázi tvoří mikročastice, na kterých je v přebytku navázaná protilátka proti stanovovanému antigenu. Do reakce vstupuje stanovovaný antigen, protilátka navázaná v nadbytku na mikročasticích, enzymový konjugát a fluorogenní substrát. U techniky MEIA reaguje enzym, kterým je označen „sendvič“ s fluorogenním substrátem. Měří se intenzita fluorescence, která je přímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu.

II. Metody radioimunoanalýzy (RIA - „Radioimmunoassay“)

Jde o kompetivní (soutěživou) techniku s heterogenním uspořádáním. Pracuje se třemi reaktanty; jsou jimi stanovovány antigen, antigen značený radioizotopem a protilátka přidaná v limitovaném množství. U klasické RIA je protilátka v tekutém stavu, na rozdíl od RIA-

techniky na pevné fázi, kde je vázána v limitovaném množství na pevnou fázi, např. Sephadex.

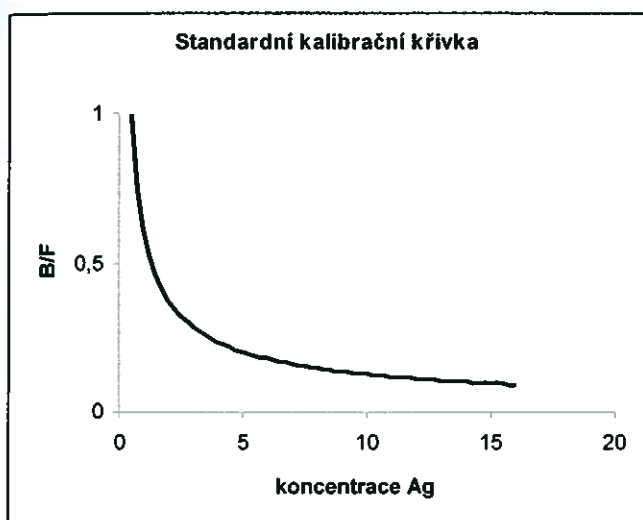
Ke značení antigenů se obvykle používá radioaktivní izotop jodu ^{125}I , který má relativně krátký poločas rozpadu (60 dnů).

1) Klasická RIA

Metoda je založena na soutěžení dvou forem téže molekuly (Ag a Ag^*) ve vazbě na limitované množství specifické protilátky.

Po ukončené imunoreakci jsou v roztoku přítomny dva radioaktivní reaktanty, volný Ag^* i komplex Ag^*-Ab , jejichž radioaktivitu můžeme stanovit; musíme však před měřením jednu či druhou složku z roztoku odstranit, poněvadž by obě dávaly signál.

K měření radioaktivity se používá detektor γ -záření, nejlépe vícekanálový nebo automatický. Z naměřené radioaktivity zjistíme koncentraci stanovovaného antigenu ve vzorku odečtením z kalibrační křivky, která má tvar hyperboly (Obr. 2).



Obr. 2 Kalibrační křivka (2)

Kalibrační graf má tvar hyperboly. Koncentraci stanovovaného antigenu ve vzorcích odečteme z kalibračního grafu (srovnáme B/F u těchto vzorků a B/F u standardních vzorků neznačeného antigenu).

B = počet molekul radioaktivního imunokomplexu (Ag^*-Ab)
F = počet molekul volného značeného antigenu (Ag^*)

2) RIA na pevné fázi (Solid-Phase)

Ke směsi stanovovaného antigenu a přidaného značeného antigenu se nepřidává protilátka v roztoku, ale je v limitovaném množství vázána na pevnou fázi – imunosorbent. Imunokomplexy se pak již nemusí oddělovat od volného značeného antigenu separačními technikami, ale mohou se oddělit přímo centrifugací apod.

3) Imunoradiometrická analýza (IRMA - „sendvičová“ metoda)

Jde o nekompetitivní (nesoutěživou) metodu, vyžadující protilátku navázanou v přebytku na pevnou fázi a protilátku značenou radioizotopem přidávanou v nadbytku.

Měří se radioaktivita značeného imunokomplexu vázaného na pevné fázi, kde užívanou značkou je radioizotop ^{125}I a měřeným signálem je zde radioaktivita imunokomplexu po odstranění nadbytečného volného značeného antigenu.

Pro techniku IRMA je vhodné použít monoklonální protilátky, které se získají metodami genového inženýrství z tzv. hybridomů. Mají vyšší specifitu než běžné protilátky polyklonální a jsou prakticky neomezeně reprodukovatelné.

III. Metody fluoroimunoanalýzy (FIA - „Fluorescent Immunoassay“)

Jde o kombinaci techniky fluorometrie s imunochemickými vyšetřovacími metodami, kde značkovacím činidlem je fluorescenční látka navázaná na antigen nebo protilátku. Metoda je vhodná k detekci a kvantifikaci biologických látek volně cirkulujících v tělních tekutinách.

1) FIA

a) kompetitivní FIA

Stanovovaný antigen soutěží s antigenem značeným fluorescenční značkou (např. fluoresceinem) o vazebné místo na protilátce přidávané v limitovaném množství.

Měříme fluorescenci značkováného imunokomplexu po odstranění volného značkováného antigenu, na který se protilátka již nedostala. Naměřená fluorescence je nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu.

b) nekompetitivní FIA („sendvičová“ technika)

Jedná se o dvouvrstvou techniku, při které je stanovovaný antigen nejprve fixován na specifickou protilátku navázanou v přebytku na stěnu kyvety nebo mikrotitrační destičky či jiný vhodný pevný nosič a následně se po inkubaci a promytí přidá „druhá protilátka“ proti jinému vazebnému místu stanovovaného antigenu, značená fluorescenčním barvivem (Ab^{FLUOR}). Vzniklý značený imunokomplex fluoreskuje; měří se intenzita fluorescence značeného imunokomplexu, která je přímo úměrná koncentraci stanovované látky.

2) FPIA (Fluorescenční polarizační imunoanalýza)

Fluorescenční polarizační imunoanalýza je kompetitivní (soutěživá) homogenní metoda, při které se měření provádí v polarizovaném světle. Využívá různé rychlosti rotace malých a velkých molekul, které vedou ke změně polarizace. Měří se intenzita polarizovaného světla.

2.3.8. Imunohistochemické metody stanovení nádorových markerů

Termínem imunohistochemie označujeme všechny techniky využívající mono nebo polyklonální protilátky, kterými lokalizujeme a vizualizujeme příslušné tkáňové antigeny. Antigeny mají v buňce funkci receptorů, enzymů nebo transkripčních faktorů a jejich detekce má velký diagnostický význam; zejména detekce antigenů sdružených s nádorovými buňkami, která umožňuje imunohistochemickou klasifikaci nádorů podle původu. Využívá se stanovení antigenů na tkáňových řezech a jejich průkaz barevnou enzymatickou reakcí. Imunohistochemické vyšetření je v současné době nedílnou součástí histopatologické diagnostiky. Výsledkem je histologický obraz, ve kterém je barevně znázorněna přítomnost vyšetřovaného antigenu.

Možnost morfologicky přesně lokalizovat antigen, který exprimuje patologicky změněná buňka, je vysoce ceněna pro zkvalitnění diagnostického procesu. Nástup imunohistochemie můžeme datovat do roku 1941, kdy byly prvně detekovány antigeny ve tkáních pomocí fluoresceinem značené protilátky tzv. primární protilátkou. Bouřlivý vývoj oboru nastal po roce 1976, kdy Milstein a Köhler připravili protilátky proti jednomu epitopu antigenní molekuly, tzv. monoklonální protilátky. Koncem sedmdesátých let byly imunohistochemické metody zdokonaleny natolik, že by bylo možno využívat formolem fixované a do parafínu zalévané tkáňové řezy (5).

I. Základní pojmy v imunohistochemii

1) Antigen

Je komplexní molekula rozpoznávaná imunologicky kompetentními buňkami; jde o proteiny, glykoproteiny a proteoglykany.

2) Protilátka

Je bílkovina produkovaná plazmatickými buňkami. Je tvořena dvěma lehkými a dvěma těžkými řetězci (vždy dva stejné lehké a dva těžké řetězce).

Při imunizaci organismu dochází ke stimulaci B lymfocytů a jejich proliferaci a diferenciaci na plasmatické buňky. Je produkováno spektrum protilátek proti různým epitopům příslušného antigenu s různou schopností se na ni vázat – tj. tzv. polyklonální protilátka.

Pokud by se aktivoval jediný B lymfocyt, klon plazmatických buněk, který by z něho vznikl, by produkoval protilátku proti jedné antigenní determinantě – tzv. monoklonální protilátku.

Monoklonální protilátka pro imunohistochemii jsou produkovány klonem buněk vzniklých hybridizací myelomových (tj. nádorových) buněk s plazmatickými buňkami imunizovaného dárce. Myelomové buňky jsou pěstovány v tkáňové kultuře nebo po inokulaci v peritoneální dutině myši.

3) Markery

Abychom mohli pozorovat specifickou vazbu mezi příslušnou složkou tkáně a protilátkou, je třeba ji zvýraznit markerem – značkou (fluorochrom, biotin, enzym).

a) Fluorochromy

Jsou barviva, která vykazují fluorescenci. Princip fluorescence spočívá v tom, že excitační světlo vede k přeskoku elektronů v molekule barviva na energeticky vyšší hladinu. Při následném skoku zpět se vysvítí světlo o jiné, delší vlnové délce. Fluorescence není stabilní a vybledne (vysvítí), preparát je proto nutno sledovat co nejdříve po proběhlé reakci. Orientace v preparátu pro fluorescenční mikroskop je těžší, protože se nedobarvují jádra. Pokud chceme mít jádra přibarvená, je nutno použít speciální filtr, dvojexpozici nebo konfokální mikroskop.

Barviva : ● fluorescein iso-thiocyanát (FITC) – zelené zbarvení

● rhodamin (tetramethylrhodamin-iso-thiocyanát – TRITC) – červené zbarvení

- texaská červeň (Texas red) – červené zbarvení
- Hoechst 33258 – modré zbarvení
- DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol) pro barvení DNA – modré zbarvení

b) Biotin

Prokazuje se vazbou se značeným avidinem. Avidin má schopnost vázat čtyři molekuly biotinu; některá vazebná místa jsou volná (váže se biotinem značená protilátka) a některá vyplněná komplexem biotin-peroxidáza (resp. biotin-alkalická fosfatáza). Enzym, navázaný ve výrazně vyšším počtu (o 2 molekuly enzymu více na každou značenou protilátku), štěpí specificky enzymatický substrát a vyvolává charakteristickou změnu zbarvení o značně větší intenzitě než bez vazby avidin-biotin.

c) Enzymy

Jako markery se používají velmi stabilní enzymy s relativně nenáročnými podmínkami pro úspěšný průkaz :

- alkalická fosfatáza (AP)
- křenová peroxidáza (HRP – horse radish peroxidase)
 - vizualizace se provádí pomocí DAB (diaminoazobenzidin) – působením peroxidázy vznikají nerozpustné černé (hnědé) elektrodenzní precipitáty (7)

II. Odběr a zpracování tkání pro imunohistochemii

1) Odběr

Materiál pro zpracování se nejčastěji získává operativně (biopsie), dále se uplatňuje i metoda seškrabování, odtlačení či odsátí. Odebíraná tkáň může být zmrazena a krájena na zmrazovacím mikrotomu – kryostatu; nakrájené řezy je pak třeba fixovat v chlazeném acetonu nebo methanolu po dobu 10 minut. Jsou-li tkáně fixovány v běžném fixativu (alkoholové fixační roztoky, Bouinova tekutina, formol – použití zejména v imunohistopatologii), jsou nejčastěji zalévány do parafinu.

2) Fixace

Metody fixace tkáňových řezů se dělí dle charakteru na fyzikální (fixace teplem či chladem) a chemické (využívají fixačních médií).

a) fyzikální fixace

a₁) tepelná

Jde o fixaci pomocí mikrovlné trouby, kdy vzorek povaříme v chemickém fixativu po dobu milisekund až několika sekund (max. 60), což výrazně urychlí fixaci a usnadňuje i průkaz antigenů

a₂) chladová

Zmražení musí být velmi rychlé, proto volíme co nejnižší teplotu (kapalného dusíku), jež vede ke vzniku velmi malých krystalků či amorfní vody, která nepoškodí membrány buněk a morfologii tkání.

b) chemická fixace

b₁) fixace ve formolu (formaldehydu)

Formol tvoří methylenovými můstky mezi zásaditými aminokyselinami ve tkáni prostorovou síť, která brání průniku protilátky k epitopu. Antigenní součásti molekuly je tedy třeba obnažit natrávením proteolytickými enzymy (pepsin, papain), použitím detergentů nebo metodou regenerace antigenu („antigen retriever“), která spočívá v povaření řezů v citrátovém nárazníku v mikrovlné troubě.

- fixační roztok : 40% formaldehyd 100 ml

destilovaná voda 900 ml

4g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

6,5g Na_2HPO_4

b₂) fixace v Bouinově tekutině

Fixační roztok jen slabě proniká do tkaniva a snižuje se ochrana determinant buněčných membrán, intermediární filament; tkáně jsou křehké a řezy obtížně adherují na sklíčko.

- fixační roztok : 40% formaldehyd 250 ml

1% kys. pikrová 750 ml

ledová kys. octová 5 ml

c) speciální fixační postupy

Využívají se pro důkaz antigenů na subcelulární úrovni (14).

- pre-embedding : imunohistochemická reakce proběhne před zalitím do parafinu

- post-embedding : imunohistochemická reakce proběhne po nařezání řezů přímo na sítkách

3) Zalévání

Aby bylo možno zhotovit dostatečně tenké řezy, je nutné tkáň zpevnit zalitím do zalévacích medií, nejčastěji parafinu či celoidinu (nitrocelulosa). Tkáň, které byly pouze zmrazeny, je možno krájet na kryostatu i bez zalití.

Většina zalévacích medií není mísitelná s vodou, proto je nutno tkáň před zalitím dokonale odvodnit stoupající řadou alkoholů a prosytit rozpouštědlem zalévacího média (toluen, aceton, ...), které současně vzorek projasní - učiní ho transparentním.

4) Krájení

Řezy se krájí na sáňkových nebo rotačních mikrotomech s ocelovými, skleněnými nebo diamantovými noži; pro imunohistochemii jsou využívány co nejtenčí řezy (5 μm). Řezy jsou po nakrájení přeneseny na podložní sklo a nataženy na kapce vody; k lepení řezů na podložní sklo se používají speciální syntetická lepidla (poly-L-lysin, APES- 3-amino-propyl-triethoxysilan). Parafínové řezy jsou odparafínovány a převedeny do vody či nárazníkového roztoku.

III. Typy imunohistochemických metod

1) Metoda přímá

Používá značenou primární protilátku; jako marker se používají fluorochromy, enzymy nebo částice koloidního zlata. Nevýhodou je nízká citlivost.

2) Metoda nepřímá

Na antigen se naváže specifická, neznačená primární protilátka, která může být jak polyklonální tak monoklonální. Tu pak prokazujeme další imunitní reakcí se značenou

sekundární polyklonální protilátkou.

3) Amplifikační metody

Slouží k zesílení signálu v případě, že množství molekul antigenu ve tkáni je nízké.

a) PAP (peroxidáza-anti-peroxidáza), APAAP (alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza)

Na antigen je navázána primární protilátka, na níž se váže sekundární, enzymem značená, protilátka reagující s jejím Fc fragmentem. Druhé vazebné místo (Fab) je volné a reaguje s protilátkou proti enzymu (PAP, APAAP); po přidání enzymu dojde k jeho vyvázání na specifickou anti-enzym protilátku. Výsledkem je zvýšení počtu molekul enzymu na jeden antigen a k zesílení signálu.

b) ABC metoda (avidin-biotin komplex), LAB metoda

Obě metody využívají vazby mezi biotinem a avidinem; primární nebo sekundární protilátka je značena biotinem, následně dochází k jeho vazbě s avidinem nebo avidin-biotinovým komplexem (ABC), značeným křenovou peroxidázou (7).

4) Současný průkaz dvou antigenů

Dva antigeny lze prokazovat na velmi tenkých sériových řezech, kdy na jednom řezu prokazujeme jeden antigen a na paralelním druhý. Výhodnější je však současný průkaz dvou antigenů v jednom řezu nejčastěji prováděný s použitím dvou rozdílných fluorochromů. Vazba může probíhat současně nebo postupně; výsledky se fotografují buď nadvrát s různými filtry nebo současně pomocí kombinovaného filtru (5).

3. NÁDOROVÝ MARKER

3.1. Obecná charakteristika nádorových markerů

Nádorové markery jsou molekuly převážně proteinového charakteru, které jsou přítomny v organismu v důsledku vzniku a vývoje maligního procesu. Jejich výskyt ve tkáni zhoubného nádoru (celulární nádorové markery) a v tělních tekutinách (humorální ,hlavně sérové nádorové markery) souvisí s růstem nádoru v organismu; jsou produkovány buď samotným nádorem, nebo jinými tkáněmi jako odpověď na maligní proces v organismu (indukované nádorové markery, např. proteiny akutní fáze).

Přítomnost v tělních tekutinách je podmíněna přechodem těchto látek z místa syntézy do cirkulace. Koncentrace nádorových markerů v séru má obvykle přímý vztah k typu a rozsahu onemocnění. Vzhledem k širokému spektru nádorových onemocnění neexistuje dosud univerzální nádorový marker, a ani senzitivita (správný záchyt nemocných) při dostatečné specifitě (správná negativita u lidí bez nádorového onemocnění) nedosahuje ideálních 100%. Proto tedy nezvýšená koncentrace nádorového markeru není ještě důkazem nepřítomnosti maligního onemocnění, a naopak pozitivní výsledek nemusí nutně znamenat zhoubný nádor.

Diagnostický práh nádorových markerů umožňuje v příznivých případech odhalit nádor o hmotnosti 1 mg, tedy asi 10^6 maligních buněk, zatímco klinická diagnóza bývá určena většinou až u nádoru, který obsahuje nejméně 10^9 buněk (15).

Snahou je nalézt takové markery, které by byly orgánově specifické, detekovatelné v co nejčasnějším stadiu maligní transformace, které by korelovaly s růstem nádoru, stadiem, prognózou a odrážely efekt terapie (13).

3.1.1. Ideální nádorový marker

Tumorový marker by měl v ideálním případě splňovat několik základních kritérií, aby byl klinicky co nejlépe využitelný jak pro stanovení diagnózy, tak pro určení prognózy a sledování efektu terapie případné léčby. Ke konkrétním požadavkům kladeným na nádorové markery zaváděné nově do praxe patří :

a) Vysoká specifičnost vzhledem k malignímu onemocnění

Pacienti bez zhoubného novotvaru 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.

b) Vysoká orgánová specifičnost

Pozitivní hodnota tumorového markeru by měla cíleně vypovídat o postižení konkrétního orgánu. Specifičnost mnohých tumorových markerů není velká. Na druhé straně většina nezhoubných příčin vyvolává jen mírné či střední zvýšení koncentrace tumorového markeru.

c) Vysoká citlivost

Jedná se o schopnost laboratorního ukazatele prokázat přítomnost zhoubného nádoru v počátečním stádiu (T1, event. T2). Množství tumorových markerů nesplňuje ani tento předpoklad a v dostatečně vysokém procentu jsou pozitivní až u velkých a zejména generalizovaných tumorů. Z tohoto důvodu se jen výjimečně hodí pro včasný záchyt zhoubných novotvarů. Citlivost a specifičnost každého testu spolu neoddělitelně souvisí; jejich poměr navíc závisí na hodnotě, považované za hraniční pro hodnocení výsledku testu, tzv. cut-off value (diskriminační hodnota). Má-li test při 95% specifičnosti citlivost menší než 50%, je pro diagnostiku nepoužitelný. Citlivost můžeme zvýšit při kombinaci několika tumorových markerů, avšak za cenu nižší specifičnosti (většího počtu falešně pozitivních výsledků).

d) Korelace mezi výší laboratorního parametru a velikostí nádoru
(množstvím nádorových buněk)

Koncentrace tumorových markerů závisí nejen na rozsahu nádoru (staging), ale i na stupni zralosti jeho buněk (grading), dále na jejich schopnosti produkovat příslušný marker a vyplavovat ho do krve, což je dáno např. i stupněm prokrvení nádoru (10).

3.1.2. Oblasti užití tumorových markerů

I. Screening zhoubných nádorů

K vyhledávání zhoubných novotvarů u asymptomatických jedinců se tumorové markery nehodí pro relativně nízkou citlivost a nedostatečnou specifickou, a to jak vzhledem k přítomnosti maligního onemocnění, tak i k postižení určitého orgánu. Na druhé straně mohou být užitečné při vyšetřování rizikových skupin jedinců (Tab. 3), ohrožených konkrétním nádorem (10).

Tab. 3 Příklad využití tumorových markerů pro screening u ohrožených skupin osob (10)

Tumorový marker	Riziková skupina	Ohrožení nádorem
AFP	cirhotici, zejména následkem chronické virové hepatitidy B nebo C	karcinom jater
TPA	pracovníci v riziku určitých organických karcinogenů	karcinom močového měchýře
kalcitonin	příbuzní nemocného s uvedenou diagnózou (familiární výskyt)	medulární karcinom štítné žlázy
paraprotein (M – komponenta)	nemocní s benigní monoklonální hyperimmunoglobulinémií	mnohočetný myelom
PSA	muži nad 50 let věku	karcinom prostaty

II. Diagnostika zhoubného novotvaru

Z podobných příčin nejsou tumorové markery obvykle vhodné ani pro primární diagnostiku. Výjimku tvoří např. pozitivní nález AFP, který potvrzuje podezření na primární karcinom jater či teratom, nebo NSE u podezření na malobuněčnou rakovinu plic.

III. Určení stadia nádoru a jeho prognózy

Vysoké hodnoty tumorového markeru obvykle znamenají pokročilé stadium onemocnění (T3, T4; generalizace tumoru). Z hlediska stanovení prognózy znamenají tumorové markery další faktor, nezávislý na ostatních obvyklých ukazatelích prognózy.

Je nutné si však uvědomit, že výška hladiny tumorového markeru nezávisí jen na velikosti nádoru, ale i na řadě jiných faktorů, které nemají s prognózou nic společného.

IV. 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. Uvádí se, že tumorové markery mohou upozornit na recidivu až o několik měsíců dříve než zobrazovací techniky (4).

3.1.3. Základní přehled tumorových markerů

A) Nádorem tvořené substance

- a) antigeny - onkofetální : a₁) „klasické“ – AFP, CEA
 - a₂) „carbohydrats antigens“ – CA 19-9, CA 125, CA 15-3, ...
 - a₃) ostatní – CIFRA 21-1
 - onkoplacentární : hCG
 - specifické : PSA
 - proliferační : TPA (TPS)
 - paraproteiny
- b) hormony - kalcitonin, ACTH
- c) enzymy - NSE, PAP
- d) metabolity - kys. vanilmandlová, kys. homovanilová
- e) onkogeny a antionkogeny - BRCA 1, p53, ...

B) S nádorem sdružené markery

- a) proteiny v plazmě - CRP, beta-2- mikroglobulin, ferritin, ...
- b) receptory
- c) jiné - polyamidy, Hb ve stolici

3.2. Charakteristika jednotlivých tumorových markerů a jejich význam

3.2.1. Onkofetální antigeny

I. „Klasické“ onkofetální antigeny

1) AFP (alfa-1-fetoprotein)

Je glykoprotein (4% molekulové hmotnosti tvoří sacharidy) podobný albuminu, je jedním z prvních známých onkofetálních antigenů; byl popsán v roce 1963. Je tvořen za fyziologických podmínek fetálními játry a žloutkovým váčkem a přechází do krve gravidních žen.

Výrazné změny jeho koncentrace v séru během těhotenství mohou indikovat fetální malformace (Downův syndrom, rozštěpové vady). Předpokládá se vliv AFP na buněčný růst a diferenciaci, jeho transportní funkce i podíl na udržování osmotického tlaku, kdy nahrazuje albumin.

Zvýšení mohou znamenat z benigních onemocnění hepatitidu, cirhózu nebo nekrózu jater a samozřejmě také graviditu. Po prodělané virové hepatitidě může zvýšení AFP přetrvávat 6-10 týdnů asi u 50% nemocných. Ke zvýšené produkci tohoto markeru dochází při regeneračních pochodech v játrech.

Z maligních příčin je AFP zvýšen především u primárních karcinomů jater, zvláště málo diferencovaných, a hepatoblastomů, dále u nádorů germinálních. Méně často je zvýšen u karcinomů zažívacího traktu včetně pankreatu.

AFP pro svoji vysokou senzitivitu bývá využíván ve screeningu hepatocelulárního karcinomu u rizikových skupin. Nemocní s cirhózou, nosiči HBsAg, s deficiencí α_1 -anti-trypsinu by měli být vyšetřováni 2× ročně. Zvýšení AFP v těchto případech je na rozdíl od benigních afekcí markantní. Hodnoty nad 200 $\mu\text{g/l}$ jsou suspektní, hodnota cut-off 1000 $\mu\text{g/l}$ je diagnosticky průkazná pro maligní nádor jater (4).

2) CEA (karcinoembryonální antigen)

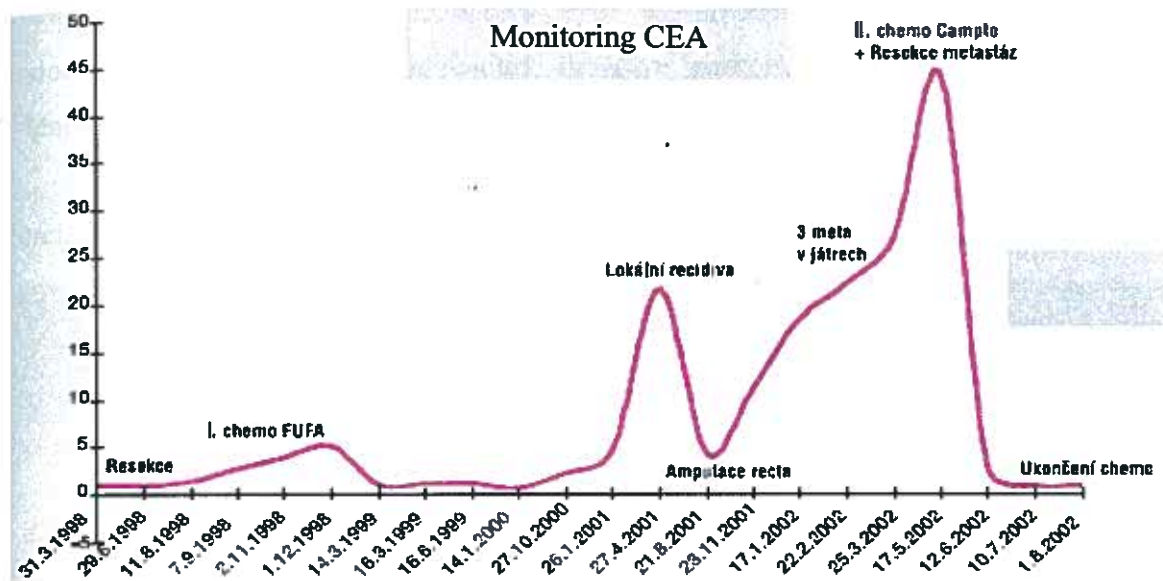
Je glykoprotein (641 aminokyselin, 45% molekulové hmotnosti tvoří sacharidy), který je silně imunogenní. Tvoří komplexy s imunoglobuliny třídy G i M a má nepřímý imunopresivní vliv na T-lymfocyty. Patří do skupiny molekul, které ovlivňují buněčnou adhezi. Za fyziologických podmínek probíhá jeho intenzivní produkce u plodu, nejvyšší hodnoty bývají kolem 22.týdne. Vzhledem k možnému transplacentárnímu přechodu může být jeho sérová hladina zvýšena u malého procenta gravidních žen.

Zvýšená hodnota v séru se může vyskytovat u kuřáků, při zánětlivých procesech gastrointestinálního traktu i plic, u hepatitid, cirhóz, pankreatitid i u autoimunitních chorob. Metabolizuje se v Kupferových buňkách (desialylace), potom se eliminuje hepatocyty. Jeho poločas v cirkulaci je závislý na obsahu kyseliny sialové. Je velmi heterogenní, bylo popsáno více než 36 variant (10).

Jako velmi vhodná se ukazuje detekce CEA v rámci primární diagnostiky zejména dobře diferencovaných kolorektálních karcinomů, karcinomů plic a mléčné žlázy. Hladiny CEA vyšetřené před zahájením terapie mohou být dobrým prognostickým ukazatelem. U nemocných II. a III. klinického stádia kolorektálního karcinomu byla prokázána korelace předoperačních hodnot CEA a doby přežití, podobně je tomu i u karcinomu prsu. Na základě předoperačních hodnot je možné také posoudit možnost radikálního zákroku u kolorektálních karcinomů. Senzitivita CEA pro detekci relapsu kolorektálního karcinomu je při 90% specifitě kolem 61%. Pokles hodnoty CEA ve 4.týdnu po chirurgickém zákroku může poskytnout informaci o úspěšnosti operace, podobně je užíván k hodnocení efektu chemoterapie a radioterapie.

CEA bývá zvýšen také u karcinomu pankreatu a žlučových cest, sigmoidea (Obr. 4), nádorů pohlavních orgánů (veječníky, děloha, prostata, testes) močového měchýře, ledvin, štítné žlázy, nádorů oblasti ORL, glioblastomů i meduloblastomů (15).

Zvýšení se nachází i u některých benigních afekcí : mamopatie, cirhózy jater, ulcerózní kolitidy, plicního emfyzému a střevních polypů .



Obr. 4 Sledování průběhu onemocnění a efektu léčby u karcinomu sigmoidea pomocí hodnot CEA (6)

II. Komplexní glykokonjugáty (CA – antigeny)

1) CA 19-9

Jde o glykoproteinový antigen mucinózního typu příbuzný antigenu krevní skupiny Lewis H. Je eliminován výhradně žlučí, proto i mírná cholestáza může zvýšit jeho hodnoty v séru nad normu. Až 20% nemocných s benigními afekcemi v oblasti hepatobiliární a pankreatické má zvýšenou hodnotu tohoto markeru, v případě obstrukční žloutenky až 40%. U benigních onemocnění střeva, žaludku a ovarii bývá zvýšen v 5-10%.

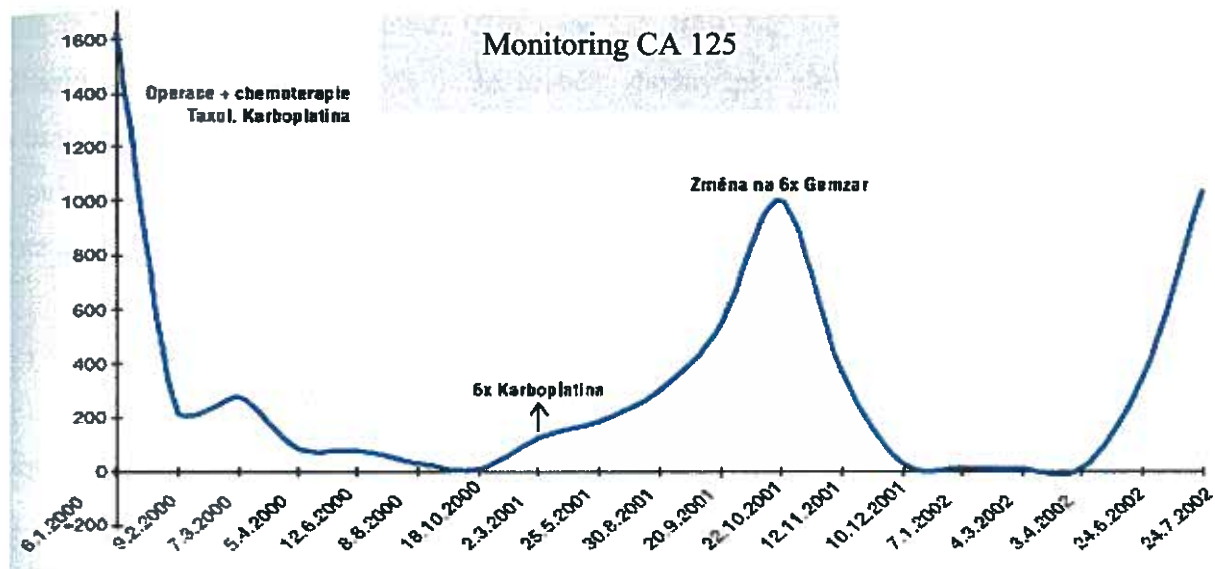
Produkují jej dobře diferencované karcinomy pankreatu, žlučových cest, kolorekta, žaludku, mucinózní karcinomy ovaria, vzácně též karcinomy endocervixu, plic i mléčné žlázy. V málo diferencovaných karcinomech je jeho produkce nižší a úplně chybí u anaplastických nádorů (4).

2) CA 125

Patří do skupiny nádorových markerů diferenciačního typu. Je to glykoprotein fyziologicky produkováný ve fetálním coelomovém epitelu. Jeho koncentrace v séru koreluje s velikostí nádoru.

Zvýšená hladina CA 125 v séru byla pozorována u benigních afekcí ovarií a endometria, u hepatopatií, pankreatitid, dráždění peritonea a pleury, dále fyziologicky v těhotenství nebo v průběhu menstruace.

Screening CA 125 je doporučován především u žen s dědičným syndromem ovariálního karcinomu (Obr. 5).



Obr. 5 Sledování průběhu onemocnění a efektu léčby u karcinomu ovarií pomocí hodnot CA 125 (6)

Sérová hladina CA 125 je významná především pro sledování efektu terapie a pro dlouhodobé monitorování nemocných s karcinomem ovarií, především nemucinózního typu, tj. u seriózních a nediferencovaných karcinomů ovaria. Vysoké hodnoty, které se po primární terapii nesníží, jsou indikací k reoperaci. Zvýšené koncentrace byly pozorovány rovněž u karcinomů endometria i dalších gynekologických malignit, dále u karcinomu prsu, pankreatu a plic. Zvýšená hladina CA 125 u karcinomu prsu může signalizovat plicní metastázy, obzvláště v kombinaci s pleurálním výpotkem (10).

3) CA 72-4 (antigen TAG 72)

Jedná se o glykoprotein mucinového typu o molekulové hmotnosti 48 000 Da. Fyziologická produkce CA 72-4 je významná v epiteliálních buňkách orgánů zažívacího

traktu v embryonálním období. Byl prokázán i v dospělé tkáni plic, genitálním traktu a zažívacích orgánů.

CA 72-4 je produkován a v určitém nízkém procentu prokazován i v séru nemocných s benigním postižením žaludku, střeva a mléčné žlázy.

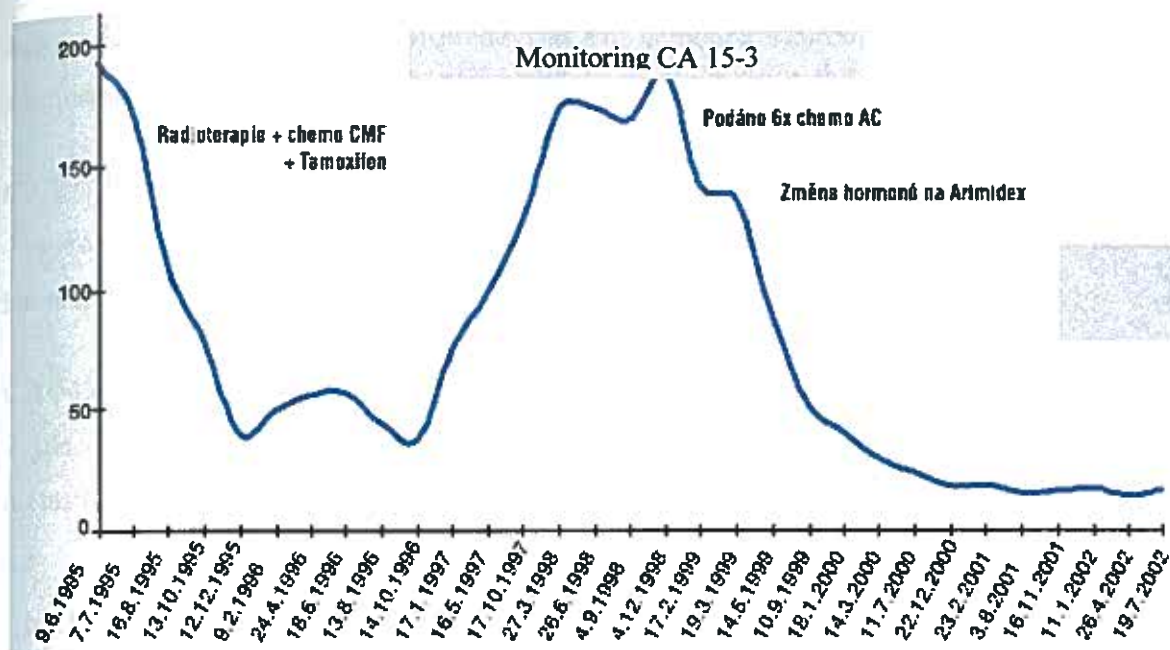
Sérový CA 72-4 je významný především pro sledování maligního onemocnění žaludku, kde vykazuje vyšší senzitivitu než CEA nebo CA 19-9. Má vysokou specifitu (při obvyklé diskriminační hranici až 100%). Je rovněž vhodný pro sledování průběhu onemocnění karcinomu dolní třetiny jícnu, tlustého střeva a pankreatu, event. mucinového typu ovariálního karcinomu. Vhodně doplňuje sledování nemocných s nádory GIT, kteří mají krevní skupinu Lewis a-/b- (5-10% populace), proto neprodukuje CA 19-9.

4) CA 15-3

Patří mezi markery diferenciačního typu; je to onkofetální mucinový glykoprotein bez orgánové specificity.

CA 15-3 bývá produkován především nádory žlázového epitelu a epitelu mléčné žlázy. Jeho intracelulární hladina koreluje se stupněm diferenciace maligních tkání. Patologické zvýšení v séru v rámci primární diagnostiky je typické pro karcinom prsu (Obr.6), méně často bývá marker zvýšen u nádorů GIT (včetně pankreatu), bronchů a gynekologických nádorů. Je nejvhodnějším markerem pro sledování nemocných s karcinomem prsu vzhledem k možné další progresi i hodnocení terapeutických efektů. Senzitivita markeru přímo koreluje se stadiem choroby, proto je vhodný pro detekci prolapsu vzhledem k časnému zachytu návratu choroby – až 6 měsíců před klinickou manifestací.

Falešná pozitivita v séru je možná u hepatopatií, cholangitidy, plicních onemocnění, renálních poruch, gravidity, endometriózy, mastopatie (15).



Obr. 6 Sledování průběhu onemocnění a efektu léčby u karcinomu prsu pomocí hodnot CA 15-3 (6)

5) Další CA-antigeny

CA M26 a CA M29

- patří mezi muciny asociované s karcinomy; jsou užívány pro sledování karcinomu prsu, kde vykazují poměrně vysokou specifitu, ve srovnání s CA 15-3 však nižší senzitivitu

CA 242

- marker patří mezi nové výborné parametry v oblasti karcinomů pankreatu a kolorekta, zvláště výhodná je jeho nízká falešná pozitivita u benigních hepatobiliárních a pankreatických postižení

CA 195

- jde o heterogenní glykoprotein užívaný pro monitorování nemocných s karcinomy kolorekta, pankreatu, jater event. dalších malignit

CA 50

- na rozdíl od antigenu CA 19-9 je CA 50 produkován i osobami s krevní skupinou Lewis

a-/b-; jeho vyšetření má význam především pro nemocné s karcinomem pankreatu i dalších karcinomů GIT a u gynekologických nádorů (karcinomy těla a hrdla děložního)

CA 27.29

- prokazuje se monoklonální protilátkou namířenou proti antigenu z ascitu při metastázách karcinomu mléčné žlázy

CA 549

- jde o kyselý glykoprotein mucinového charakteru vhodný pro sledování průběhu metastazujícího karcinomu prsu

III. Další onkofetální tumorové markery

1) CYFRA 21-1 (cytokeratin fragment)

Používá se pro detekci fragmentů cytokeratinu 19; zvýšená exprese tohoto proteinu je ve tkáni karcinomu plic, zvláště nemalobuněčného typu.

Stanovení markeru CYFRA 21-1 v séru nemocných s maligním onemocněním má význam především pro sledování průběhu onemocnění a efektu terapie u nemalobuněčného karcinomu plic, kde je výhodnější než SCCA. Nejvyšší senzitivitu u těchto nemocných vykazuje karcinom z dlaždicového epitelu (55%), pak následuje velkobuněčný karcinom (35%) a adenokarcinom plic (28%). Rovněž pro některé gynekologické nádory (nekeratinizující karcinom cervixu dělohy), nádory ORL oblasti a močového měchýře je tento marker doporučován.

Zvýšené hodnoty v séru byly nalezeny u nemaligních onemocnění typu chronického renálního selhání, u některých poruch jater a GIT (cirhóza, ne však hepatitida nebo pankreatitida). Rovněž u určitého procenta nemaligních onemocnění plic (astma, tuberkulóza, akutní infekce) mohou být koncentrace CYFRA 21-1 v séru zvýšeny (4).

2) SCC (SCCA) - antigen skvamózních buněk

Byl popsán v roce 1984; je to glykoprotein, který patří mezi inhibitory serinových proteináz, fyziologicky je produkován především v diferencovaných epidermoidních

buňkách plodu, ale i u zdravých dospělých, zejména ve středních, méně často povrchových vrstvách epitelu.

Falešná pozitivita bývá nacházena v graviditě, u generalizovaného ekzému či lupénky, pemfigu, u zánětu plic, ledvin, jater i benigních gynekologických afekcí, např. ovariálních cyst i u mastopatií. Také dialyzovaní nemocní mívají vyšší hodnoty.

Hodnoty SCCA v séru bývají zvýšené u nemocných s velkobuněčnými epidermoidními karcinomy plic, nádory krku a hlavy, epidermoidními nádory krčku děložního, vagíny, vulvy i v adenokarcinomech endocervixu, ovarií a plic. Nejčastěji bývá marker vyšetřován pro monitorování nemocných s epidermoidními karcinomy plic a gynekologických lokalizací. Pro velmi krátký biologický poločas je marker užíván i pro hodnocení efektu terapie, ale není vhodný pro screening ani k určení primární diagnózy (15).

3) TATI (tumor asociovaný trypsinový inhibitor)

Jedná se o polypeptid, který je fyziologicky produkován během vývoje plodu. Bývá zvýšen v séru pacientů s pankreatitidou, obstrukcí žlučových cest a po těžkých chirurgických zákrocích.

Jeho produkce a přechod do séra u onkologických nemocných je projevem biosyntézy v maligních buňkách (mucinózní cystadenokarcinomy ovarií), event. nespecifické reakce na maligní zvrát u karcinomu žaludku, žlučových cest a cervixu. U nemocných s karcinomem ovarií III. a IV. stádia se zdá být velmi dobrým ukazatelem prognózy.

4) MSA, MCA

MSA (mamární sérový antigen)

Jde o marker specifický pro maligní onemocnění mléčné žlázy; je užíván především pro sledování průběhu nemoci.

MCA (antigen mucinózních karcinomů)

Jedná se o glykoprotein mucinového typu o vysoké molekulové hmotnosti, bývá někdy vyšetřován jako marker karcinomu prsu místo CA 15-3. Jeho vyšetřování bývá také indikováno pro potvrzení nadhraničních zvýšení CA 15-3 u nemocných sledovaných pro

karcinom prsu, protože jeho vzestup při progresi nastává většinou dříve. Malá část nemocných na progresi odpovídá vzestupem pouze jednoho z těchto markerů.

3.2.2. Onkoplacentární antigeny

I. hCG (lidský choriový gonadotropin)

Byl popsán v moči těhotných žen již v roce 1928 jako látka placentárního původu s gonadotropními účinky. Je to glykoprotein tvořený podjednotkami α a β . Fyziologicky je produkován trofoblastem a placentou s maximem v 10. až 12. týdnu těhotenství; jeho funkcí je udržovat žluté tělísko, stimulovat tvorbu progesteronu, inhibičním efektem na T-lymfocyty podporovat imunotoleranci plodu. hCG se nejčastěji stanovuje pro časnou diagnózu těhotenství (včetně mimoděložního) či hrozícího potratu. Falešná pozitivita je popisována u myomů a ovariálních cyst.

V onkologii je specifitější vyšetřování β -podjednotky (β hCG). Zvýšené hodnoty svědčí pro přítomnost nádoru trofoblastického nebo germinálního původu, tj. nádorů varlat, ovarií, choriokarcinomu, hydatiózní moly, méně často nádorů pankreatu, plic a GIT. Bylo popsáno zvýšení hCG také u nádorů prsů a ledvin. U testikulárních nádorů doplňujeme vyšetření tohoto markeru vyšetřením AFP, případně ferritinu, NSE či TPA, podle toho, který z nádorových markerů byl při stanovení diagnózy prokázán. hCG má význam diagnostický, prognostický i pro hodnocení efektu terapie. V případě embryonálních karcinomů je monitorování pomocí β hCG a AFP nezbytné.

Vysoké hodnoty nacházíme v séru i moči u mola hydatidosa; při jejím přechodu v choriokarcinom dále rostou a jsou řádově vyšší než v těhotenství (4).

II. SP1 (β_1 – specifický těhotenský glykoprotein)

Jde o heterogenní složku proteinového charakteru vyskytující se v séru těhotných žen; fyziologicky je produkován placentou. Je používán pro diagnostické posouzení charakteru gestačních trofoblastických tumorů (choriokarcinom, invazivní a hydatidozní mola), ev. u neseminomových germinálních nádorů varlat.

3.2.3. Proliferační tumorové markery

TPA (TPS) - tkáňový polypeptidový antigen

Jde o fragment cytokeratinových podjednotek intermediálních filament. Dosud bylo prokázáno 20 typů cytokeratinů, které spolu vytvářejí heteropolymery; každá epiteliální buňka vykazuje charakteristickou kombinaci cytokeratinů, a to v závislosti na histologickém typu tkáně. Původní stanovení TPA je založeno na detekci cytokeratinů 8, 18 a 19.

Fragmenty cytokeratinů 8 a 18 jsou detekovány soupravou s monoklonální protilátkou pro stanovení TPS (specifický TPA). Nemaligní postižení jater (cirhóza, hepatitida), event. některá infekční onemocnění mohou být příčinou falešně pozitivních hodnot těchto markerů v séru.

Markery cytokeratinového typu vykazují obecně vyšší senzitivitu a nižší specifitu u širokého spektra nádorových lokalizací. Jsou vhodné především pro dlouhodobé sledování a monitorování účinnosti terapie u nemocných s karcinomem prsu, ovarií, děložního čípku, prostaty, ledvin, močového měchýře, plicních tumorů, nádorů GIT a ORL oblasti. Hladiny těchto markerů, reflektující proces nádorové proliferace, se zvyšují obvykle dříve, než je možné nádory klinicky rozpoznat. Obzvlášť významné je však jejich sledování během terapie, zvýšená hladina TPA či TPS rychle poklesne v případě účinné léčby.

3.2.4. Paraproteiny

Monoklonální řetězce imunoglobulinů (paraproteiny) jsou stanovovány u nemocných s mnohočetným myelomem, u chronické lymfatické leukemie, lymfomu, Waldenströmovy makroglobulinemie nejen v séru, ale i v moči (Bence-Jonesova bílkovina). Zejména pro mnohočetný myelom je vyšetření paraproteinů jedním z hlavních diagnostických kritérií tohoto onemocnění.

3.2.5. Hormony

Některé maligní afekce se projevují produkcí látek hormonální povahy, jejichž množství se oproti normálu výrazně zvyšuje. Mezi ukazatele nádorového růstu tak můžeme zařadit i

řadu hormonů : kalcitonin (CT), prolaktin (PRL), adrenokortikotropní hormon (ACTH), růstový hormon (STH), parathormon (PTH), antidiuretický hormon (ADH), trijódtyronin (T3), tyroxin (T4), TSH (tyreotropin) a další. K často vyšetřovaným hormonům patří tyreoglobulin (TG), jehož vyšetřování je indikováno při monitorování pacientů s diferencovanými karcinomy štítné žlázy.

I. ACTH

Adrenokortikotropin je polypeptidový hormon tvořený 39 aminokyselinami. Vzniká v adenohypofýze jako parathormon, který má jen 5% biologické aktivity. Patologické zvýšení je u nádorů adenohypofýzy a ektopická tvorba (v nádorech v neendokrinní tkáni) je možná v malobuněčných karcinomech plic, pankreatu, prsu, žaludku nebo tlustého střeva. Zvýšení je popisováno také u benigních onemocnění (chronická plicní obstrukční choroba, obezita, stres, diabetes mellitus). ACTH z tumoru nereaguje na dexametazonový supresní test.

II. Kalcitonin

Je polypeptidový hormon z 32 aminokyselin tvořený normálně C-buňkami štítné žlázy. Potlačuje uvolňování Ca z kostí, a tak snižuje hladinu sérového Ca. Patologické zvýšení se vyskytuje u medulárního karcinomu štítné žlázy (hladina koreluje s velikostí tumoru i s výskytem metastáz), plic, prsu, ledvin, jater a u karcinoidu.

3.2.6. Enzymy

I. Prostatická kyselá fosfatáza

Jde o enzym s pH optimumem mezi 5-6, je velmi nestálá při pH > 7. Od jiných izoenzymů kyselé fosfatázy se odlišuje značnou inhibovatelností tartarátem (tartarát – senzitivní izoenzym). Patologické zvýšení nacházíme u metastazujícího karcinomu prostaty, osteosarkomů, mnohočetného myelomu, kostních metastáz jiných tumorů a u některých benigních onemocnění (hypertrofie prostaty, osteoporóza, hyperparatyreóza). Ve srovnání s PSA jde o málo specifický marker, který je z tohoto důvodu jen omezeně využíván (10).

II. Tymidinkináza (TK)

Jedná se o enzym alternativní metabolické dráhy v syntéze DNA; vyskytuje se ve třech izoenzymových formách. V lidských buňkách je zastoupen především cytosolový, fetální a mitochondriální izoenzym; v séru převažuje cytosolová forma (95%). Aktivita tohoto izoenzymu výrazně kolísá během buněčného cyklu – nejvyšší je v S-fázi. Jeho hladina v séru je tedy ukazatelem buněčné proliferace. Zvýšená hladina tymidinkinázy v séru byla prokázána u některých virových infekcí (především u herpes virů), dále u některých plicních onemocnění (fibróza, sarkoidóza, absces).

Stanovení TK je doporučováno pro určení prognózy a monitorování průběhu lymfomů, nemalobuněčných karcinomů plic, leukemií, mnohobuněčných myelomů, vzácněji karcinomů prsu, kolorekta a mozkových nádorů (astrocytomy). Koncentrace TK v séru pozitivně koreluje s velikostí tumoru i s jeho proliferační aktivitou u řady nádorových onemocnění. Vzhledem k tomu, že některá cytostatika (methotrexát, 5-fluorouracil) blokují de novo syntézu DNA, je stimulována aktivita enzymů alternativní syntézy DNA a TK vykazuje falešnou pozitivitu, je tedy třeba načasovat vyšetření tak, aby byl vliv chemoterapie eliminován (před nasazením této léčby) (4).

III. NSE (neuron-specifická enoláza)

NSE je izoenzym enolázy (enzymu glykolitické dráhy) specifický pro nervovou tkáň. Fyziologicky je produkován v nervové i plicní tkáni plodu i ve tkáních neuroendokrinního původu zdravých dospělých.

Zvýšená produkce se pozoruje u nemaligních plicních onemocnění a jaterních chorob (do 20 $\mu\text{g/l}$). Je nutno upozornit na možnost falešné positivity, kterou představuje hemolýza krve nebo dlouhé stání plné krve (např. při transportu před stažením séra).

Patologicky se výrazně zvyšuje u neuroblastomů, meduloblastomů, retinoblastomů, apudomů (malobuněčné medulární karcinomy štítné žlázy), u adenokarcinomů ledvin, prostaty, seminomů a melanomů. Nejvyšší hodnoty jsou popisovány u dobře diferencovaných ganglioneuroblastomů a ganglioneuromů. U nádorů CNS je lépe stanovovat tento marker v likvoru, protože špatně proniká do krevní cirkulace. Nejčastější indikací vyšetření NSE je

monitorování nemocných s neuroblastomy a malobuněčnými plicními karcinomy, pro zjištění diagnózy ani pro screening se však nehodí pro svou příliš nízkou citlivost (4).

IV. Alkalická fosfatáza (ALP)

Kostní izoenzym je zvýšen u osteosarkomů a osteoplastických metastáz do kostí, ale i u řady nenádorových kostních afekcí.

Jaterní izoenzym bývá zvýšen u metastatického postižení jater; současně obvykle pozorujeme i zvýšení aktivity GMT a AST. Obdobný nález však je i u nenádorových hepatopatií, např. u aktivní jaterní cirhózy.

Některé zhoubné novotvary (GIT, plic) produkují atypickou ALP, která se svými vlastnostmi podobá placentárnímu izoenzymu.

V. Laktátdehydrogenáza (LD)

Zvýšení LD je relativně časté u hemoblastických malignit (akutní leukemie, non-Hodgkinský lymfom), ale lze jej prokázat i u jiných nádorů (neuroblastom, seminom, neseminomové nádory varlete, karcinom prsu, tlustého střeva, žaludku). Jde o velmi nespecifický indikátor, ale jeho hladina koreluje s objemem tumoru.

VI. Katepsin B

Je to lyzozomální enzym, který se za fyziologických okolností účastní odbourávání intracelulárních proteinů nebo aktivace prohormonů. Za patologických stavů se jeho množství v cytosolu nádorových buněk zvyšuje; uplatňuje se při degradaci bazální membrány a umožňuje invazivní růst a metastazování nádoru. U karcinomu mléčné žlázy jeho hladina koreluje se stadiem dediferenciace. Zvýšení bylo dále prokázáno u karcinomů ovaria, tlustého střeva a rekta, žaludku a laryngu.

VII. PSA (prostatický specifický antigen)

Jedná se o glykoprotein (z 237 aminokyselin, sacharidy tvoří 10% molekulové hmotnosti) s enzymovou aktivitou serinových proteináz kalikreinového typu.

Podrobněji viz kapitola 4.

3.2.7. Sérové proteiny

I. Beta₂ – mikroglobulin ($\beta_2 - M$)

Je to glykoprotein o malé molekulové hmotnosti. Je součástí histokompatibilních antigenů (HLA) na povrchu buněk a je homologní s konstantní částí těžkých řetězců imunoglobulinů. Vyskytuje se na povrchu všech jaderných buněk, zvláště vysoká hustota je na povrchu lymfocytů.

Nejvyšší koncentraci v séru nacházíme u nádorů odvozených od lymfocytů a plazmocytů (lymfomy, chronická lymfatická leukemie, mnohočetný myelom); $\beta_2 - M$ je tvořen přímo nádorovými buňkami. Je vhodný ke sledování účinku léčby, u mnohočetného myelomu má i význam prognostický – pacienti se zvýšenou koncentrací $\beta_2 - M$ mají několikanásobně kratší dobu přežití než nemocní s normální hladinou této bílkoviny.

Z organismu se eliminuje převážně ledvinami, velký podíl je reabsorbován v proximálních tubulech, proto porucha v glomerulární filtraci vede ke zvýšení jeho koncentrace v séru. Poškození tubulů je naopak provázeno zvýšenou koncentrací v moči. Při integraci výsledků je tedy třeba vždy mít na paměti funkční stav ledvin.

Zvýšení sérových hladin $\beta_2 - M$ je pozorováno i u chronických zánětlivých onemocnění (AIDS).

II. Ferritin

Je to vysokomolekulární bílkovina patřící do skupiny α_2 -globulinů, která slouží jako zásobárna železa ve střevní sliznici a kostní dřeni. Fyziologicky je syntetizován v retikuloendoteliálních buňkách jater, sleziny, kostní dřeni a ledvin. Syntéza ferritinu je indukována nedostatkem železa v organismu. Zvýšená koncentrace ferritinu v séru byla prokázána u zánětů, hemochromatóz, hemosideróz a sideroblastických anemií.

Buňky některých nádorů, především akutní myeloblastické leukémie, Hodgkinova lymfogranulomu a mnohočetného myelomu, produkují ferritin, jehož molekula má kyslejší charakter (kyselý izoferritin) a lze ho prokázat v séru. Nespecificky může být zvýšen ferritin

i v séru u některých dalších nádorových onemocnění, jako např. u karcinomu prsu, plic, ovarii, prostaty nebo nádorů GIT; senzitivita je u těchto lokalizací obvykle nižší (10).

III. Cirkulující imunokomplexy (CIK,CIC)

Jsou nespecifické komplexy antigenů a protilátek v tělních tekutinách, které se tvoří v důsledku reakce organismu na přítomnost „cizího antigenu“. Jsou typické zejména pro autoimunitní onemocnění a chronické hepatopatie, poměrně často však doprovázejí maligní nádory různé lokalizace. Pro onkologii mají význam jako doplňující nespecifické vyšetření pro různé nádory, jako např. pro karcinom prsu, plic a leukemie.

IV. Bílkoviny akutní fáze

Patří mezi ně především následující bílkoviny : α_1 -antitrypsin, kyselý α_1 -glykoprotein (orozomukoid), heptaglobin, C-reaktivní protein a fibrinogen. Jejich zvýšená produkce je projevem zánětlivé reakce organismu na přítomnost rychle rostoucího nádoru, jedná se tedy o zcela nespecifické ukazatele.

Jiné bílkoviny, označované někdy jako negativní reaktanty akutní fáze zánětu, jeví v této situaci pokles koncentrace v séru (prealbumin, albumin, transferin).

3.2.8. Buněčné tumorové markery

Jsou to 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.

I. Proteiny nukleární matrix (NMP22)

Tyto orgánově specifické proteiny, tvořící vnitřní strukturu jádra, hrají pravděpodobně úlohu při regulaci exprese genů. Jde o proteiny, které se uvolňují do krevního oběhu a vylučují se močí. Jejich hladiny v moči nemocných s karcinomem močového měchýře dosahují senzitivitu 70% ,mohou také rychle signalizovat příznivou odpověď na terapii.

II. Malignin

Je membránový polypeptid (molekulová hmotnost 10 kDa) objevený v roce 1974. Studie potvrdily význam stanovení autoprotilátek proti maligninu (AMAS), které mají ochranný vliv před vznikem maligního onemocnění; nedostatečná tvorba je riziková. Byla prokázána také pozitivní korelace mezi hladinou antimaligninových autoprotilátek a přežitím pacientů s karcinomy. Radioizotopově značená antimaligninová protilátka se také používá jako zobrazovací test pro lokalizaci tumoru.

III. Protoonkogeny

Jsou součástí genomu zdravé buňky, kam byly vneseny viry nebo byly v genomu normálně přítomny. Jejich aktivace, způsobená např. bodovou mutací, amplifikací, translokací či inverzí, vede k přeměně na onkogeny. Produkty onkogenů jsou látky proteinové povahy, působící jako růstové faktory. Jejich působením pak může dojít k přeměně normální buňky na nádorovou. Nejznámější protoonkogeny jsou ras, myc, mdm2 a bca 1 nebo bca 2.

IV. Tumorové supresorové geny (antionkogeny)

Jde o geny, které kontrolují množení buňky. Nejznámější z nich je označován p53; řídí tvorbu proteinu, který indukuje apoptózu buněk. Karcinogenně se projeví mutace tohoto genu či jeho vyřazení z funkce. K tomu může dojít např. navázáním produktu onkogenu nebo bílkoviny tvořené buňkami infikovanými některými viry.

Geny kódující enzymy provádějící „opravy“ porušené struktury DNA mohou také podléhat mutacím; tyto tzv. „DNA mismatch repair genes“, např. hMSH₂, hMLH₁ aj., byly prokázány u nemocných s kolorektálním karcinomem a jinými typy zhoubných novotvarů.

I když výše uvedené geny jsou typickými buněčnými tumorovými markery, existují práce, které dokládají jejich časný průkaz v krvi či jiných biologických tekutinách. Tak byl mutovaný gen p53 nalezen v moči pacientů s karcinomem močového měchýře, mutovaný gen ras ve stolici pacientů s karcinomy tlustého střeva a pankreatu a oba tyto geny ve sputu nemocných s plicní rakovinou, a to mnohdy roky před klinickou manifestací. Problém pro praktické využití představuje nízká citlivost vyšetření a zejména velké množství různých mutací onkogenů (4).

3.2.9. Některé další ukazatele zhoubného nádoru

I. DU-PAN 2

Epitop rozpoznávaný touto protilátkou je mucin (80% sacharidů). Nalézá se v glandulárním epitelu pankreatu a žlučových cest biliárního systému, dále mléčné žlázy a bronchů, méně u slinných žláz, žaludku a střeva. Pozitivita testu koreluje s CA 19-9 v 70-80% případů; patologické zvýšení je u karcinomu pankreatu, žlučových cest a jater.

II. CASA (s nádorem asociovaný sérový antigen)

Patří do skupiny glykoproteidů, jejichž detekce byla umožněna přípravou specifických monoklonálních protilátek; je používán především u ovariálních karcinomů, v kombinaci s CA 125 se výrazně zvyšuje senzitivita i při určení primární diagnózy. Nadějně se zdá zjištění, že u plicních karcinomů je koncentrace CASA před zahájením terapie dobrým prognostickým indikátorem.

III. Kyselina sialová (SA)

Tímto souhrnným názvem se označují acetylované deriváty kyseliny neuraminové. Zvýšené koncentrace SA lze nalézt jednak u onemocnění spojených se změnami hladin reaktantů akutní fáze, jednak u maligních nádorových onemocnění. V tomto případě má zvýšení původ v uvolnění glykoproteinů z membrán nádorově transformovaných buněk a je považováno za nespecifický marker množství nádorové hmoty. Stanovení SA je dobře využitelné u vybraných typů nádorů (ovarium, mamma, prostata, GIT) pro rozpoznání reziduální choroby, k odhalení metastáz, k monitorování progresu onemocnění (korelace s nárůstem nádorové hmoty).

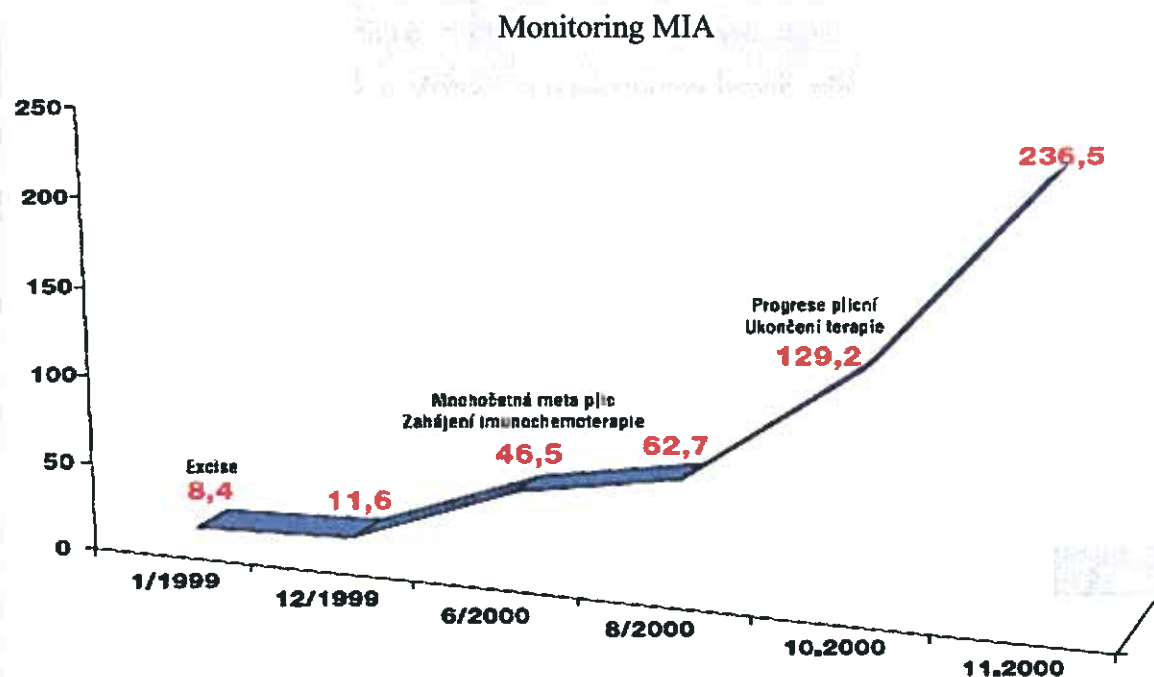
LASA (kyselina sialová vázaná na lipidy) je marker, který je užíván pro dlouhodobé sledování nemocných s karcinomem prsu, pankreatu, ovarií, prostaty, močového měchýře, ledvin, GIT i dalších lokalizací. Je pravděpodobně specifičtější ukazatelem nádorového procesu než celková sialová kyselina.

IV. MIA (protein s melanom-inhibiční aktivitou)

Je prokázáno, že MIA rozpustný protein je uvolňován z buněk maligního melanomu – exprese MIA je však závislá na histologické skladbě nádoru. V nenádorové tkáni se vyskytuje jen ve vyvíjející se a ve zralé chrupavce. Diagnostická senzitivita MIA je udávána více než 80%. Sérové hladiny jsou významně a specificky zvýšeny u pacientů s maligním melanomem (Tab. 4, Obr. 7).

Tab. 4 Změny hodnot MIA v závislosti na probíhající léčbě (6)

odběr proveden	terapie	MIA ng/ml
září 1999	radikální excize	8,44
prosinec 1999	sledování v remisi	11,44
červen 2000	mnohočetné metastázy plic, zahájena imunochemoterapie	46,50
srpen 2000	pokračování v léčbě	62,65
říjen 2000	progrese nálezu v obou plicních křídlech , ukončení léčby	129,16
listopad 2000	poslední odběr	236,50
	exitus	



Obr. 7 Sledování průběhu onemocnění a efektu léčby u melanoblastomu pomocí hodnot MIA (6)

V. Polyaminy

Spermidin, spermin a diaminy (putrescin a kadaverin) jsou deriváty aminokyselin a mohou být přítomny v moči nemocných s různými nádory, hlavně v pokročilém stadiu. Praktický význam má nyní pouze stanovení těchto polyaminů v mozkomíšním moku u meduloblastomu.

VI. Neopterin

Tvoří se především ve stimulovaných makrofázích jako součást celulární imunitní reakce na virovou infekci, na intracelulárně přetrvávající bakteriální nebo parazitální infekci, na autoantigeny a také na maligně transformované buňky, které produkují cytokiny aktivující makrofágy. Zvýšené hodnoty se nalézají zejména u hemoblastóz, u karcinomu bronchogenního, hepatocelulárního, prostaty, u některých gynekologických nádorů nebo nádorů GIT.

VII. Tumor M2-PK (nádorový izoenzym pyruvátkinázy)

Je dimerická forma tetramerního glykolytického enzymu pyruvátkinázy M2. Její produkce je typicky mimořádně zvýšena v metabolickém stavu specifickém pro nádorové buňky. Vyšetření je indikováno především u karcinomu ledvin, plic a pankreatu.

3.2.10. Perspektivní nádorové markery

I. Mammaglobin

Jde o specifický antigen tkáně mléčné žlázy (ale též nemaligní); nevyskytuje se však ve tkáni mimo prs, jako jsou kupř. mízní uzliny. Patří do rodiny uteroglobinu. Expres mRNA pro mammoglobin je nalézána u 70-80% pacientů s primárním nebo metastazujícím nádorem prsu.

II. B305D, GABA π , B726P

Pomocí těchto markerů je možno detekovat prakticky všechny druhy poměrně velmi heterogenního karcinomu prsu, a to i mikrometastázy v mízních uzlinách nebo kostní dřeni.

III. Aktivátor a inhibitor plasminogenové urokinasy (uPA; PAI-1)

Tyto markery jsou navrhovány zejména jako biologické prognostické ukazatele. Jejich koncentrace koreluje pozitivně se špatnou prognózou i u pacientek s nepostiženými lokálními mizními uzlinami a naopak nízká koncentrace ukazuje u této formy na dobrou prognózu s dlouhodobým přežíváním. Pravděpodobně podobný význam bude mít stanovení uPA a PAI-1 u karcinomů žaludku, tlustého střeva, močového měchýře, ovaria nebo endometria.

IV. Markery rodiny kallikreinů

Nadměrná exprese genu CDC91L (na chromozomu 20q11-13) se vyskytuje u třetiny pacientů s karcinomem močového měchýře.

V. Rozpusťný fragment receptoru pro IL-2 (IL-2R α)

Koncentrace tohoto markeru se ukazuje být velmi užitečným prognostickým ukazatelem pro maligní nádory krku a hlavy (dutina ústní, orofarynx, hypofarynx, larynx).

VI. Progastrin-releasing peptid (ProGRP)

Vyšetření tohoto markeru má být citlivější a specifitější pro rozpoznání malobuněčného karcinomu plic, než je NSE nebo CEA; hodí se pro časně odhalení návratu choroby.

VII. Protein S 100 B

Je velmi užitečný jako prognostický indikátor melanomu, který prokazuje metastazující stádia (III.– lokální metastázy, IV.– vzdálené metastázy) i u pacientů bez klinických známek melanomu. Je též zvýšen u gliomů a vysoce diferencovaných neuroblastomů.

VIII. Proteiny 14-3-3

Tyto proteiny regulují četné buněčné pochody, které hrají důležitou úlohu v biologii nádorů jako je apoptóza a kontrolní body buněčného cyklu. Bylo identifikováno sedm 14-3-3 genů a jeden z nich - 14-3-3 σ je přímo angažován v etiologii nádorového onemocnění. Ztráta exprese 14-3-3 σ zvyšuje citlivost nádorových buněk vůči konvenčním protinádorovým lékům, což je možno využít při terapii (8).

4. PSA A JEHO VYUŽITÍ V DIAGNOSTICE ONEMOCNĚNÍ PROSTATY

4.1. Obecná charakteristika PSA

Objev molekuly PSA bývá připisován Wangovi (1979), avšak poprvé byl PSA identifikován v prostatické tkáni Ablinem a kol. již v roce 1970. V roce 1971 Hara a kol. popsali gama seminoprotein ve spermatu, když se snažili objevit marker využitelný v soudním lékařství k identifikaci pachatelů znásilnění. Později se ukázalo, že se jedná o identickou látku s PSA. Purifikován a charakterizován byl na gelové elektroforéze Wangem a kol. v roce 1979. Od doby, kdy začal být PSA široce používán v diagnostice karcinomu prostaty, výrazně vzrostl počet provedených biopsií prostaty. Důsledkem je vyšší záchyt karcinomu prostaty a detekce časnějších stádií (12).

4.1.1. Struktura a výskyt PSA

Prostatický specifický antigen je lidský kalikrein, glykoprotein o molekulové hmotnosti 33 kDa s aktivitou neutrální serinové proteázy. Jeho molekulu tvoří 237 aminokyselin a jeden uhlovodíkový řetězec, navázaný na aminoskupinu kyseliny asparagové.

PSA je secernován epiteliálními buňkami prostaty lemujícími aciny a dukty prostatické tkáně. Vyskytuje se především ve spermatu, kde je jeho koncentrace velmi vysoká (0,2-0,5 mg/ml); nejvyšší koncentrace PSA v těle je v lumen acinů. Aby se PSA dostal do krevního oběhu, musí překonat významnou bariéru mezi prostatickým lumen a kapilární krví, zahrnující prostatickou bazální membránu, stroma, kapilární bazální membránu a kapilární endoteliální buňku.

V séru se PSA vyskytuje ve 2 formách - volný a vázaný s alfa-1-antichymotrypsinem nebo s alfa-2-makroglobulinem. Laboratorně stanovitelný je PSA vázaný na alfa-1-antichymotrypsin (cca 50-90 % stanovitelného PSA) a volný PSA (fPSA-cca 5-50 % stanovitelného PSA). V případě vazby na alfa-2-makroglobulin je molekula PSA kompletně uzavřena v této bílkovině a tento komplex tak tvoří nedetekovatelnou složku. Sérový poločas celkového PSA je 1,9 – 3,2 dny, poločas volného PSA necelé 2 hodiny (3).

4.1.2. Faktory ovlivňující hodnoty sérové koncentrace PSA

Zvýšenou hladinu celkového PSA v séru můžeme pozorovat u karcinomu prostaty, avšak i u jiných onemocnění, např. benigní hyperplazie prostaty (BHP), zánětu prostaty, při akutní retenci moči, po některých urologických manipulacích, ale též i po pohlavním styku. Semjonow a kol. při zhodnocování vyšších hodnot PSA při akutní močové retenci prokázali, že během 24-48 hodin po odhalení a zaléčení retence klesnou hodnoty PSA o 50 %. Zvýšené hodnoty PSA při akutní prostatitidě se po adekvátním přeléčení vrací k normě během 6-8 týdnů.

Po biopsii prostaty je nutno na objektivní výsledek počkat přibližně 6 týdnů. Vyšší přítomnost PSA zřejmě souvisí s porušením bazální membrány epitelu prostatických buněk a kontaktem obsahu prostatických tubulů s krevním řečištěm. Přestože poločas PSA v séru je 1,9-3,2 dny, v případě biopsie jde o doprovodnou zánětlivou reakci, která hladinu PSA drží na vyšší úrovni ještě po několik týdnů. Po transuretrální resekci prostaty se koncentrace sérového PSA zvyšuje; k bazální hladině se hodnoty PSA navracejí přibližně po dobu 20 dní. Vyšetření per rektum již v současnosti není pokládáno za zdroj zvýšeného PSA, stejně jako se většina autorů též přiklání k názoru, že ani běžná katetrizace, cystoskopie a transrektální sonografie klinicky signifikantně nezvyšují hodnoty prostatického specifického antigenu.

S nárůstem medikamentózní léčby benigní hyperplazie prostaty se pozornost soustředila také na možnost ovlivnění hodnot PSA touto léčbou. Po 6-měsíční léčbě blokátory 5- α -reduktázy (u mužů bez karcinomu prostaty) dochází k poklesu sérové koncentrace PSA v průměru o 50 %. Oproti tomu alfa-blokátory hodnoty PSA výrazněji neovlivňují.

V neposlední řadě je třeba zdůraznit, že hodnoty PSA se mohou lišit v závislosti na použití různých metodik vyšetření a diagnostických souprav od různých výrobců (12).

4.2. PSA a karcinom prostaty

4.2.1. PSA screening

Screening je definován podle Světové zdravotnické organizace (WHO - „World Health Organization“) jako vyhledávací vyšetření, výběrový test zjišťující osoby nemocné a

odlišující je od osob zdravých. Osoby pravděpodobně nemocné se vyšetřují dále, aby se u nich stanovila konečná diagnóza a po jejím potvrzení se začala adekvátní léčba. Cílem screeningu je zachycení časných (léčitelných) stádií onemocnění a snížení mortality onemocnění.

V případě screeningu PSA se využívá jeho relativně vysoké specifity pro karcinom prostaty, přičemž existují čtyři přístupy, jak snížit úmrtnost na karcinom prostaty :

1. prevence
2. zlepšení časně diagnostiky
3. zlepšení účinné léčby lokalizovaného onemocnění
4. objevení nových léčebných postupů při pokročilém onemocnění.

Prevence je obtížná, neboť etiologie karcinomu prostaty není přesně známa. Nejslibnější cestou se zdá včasná diagnóza, kterou je možné dosáhnout screeningem mužů od určité věkové hranice; v případě PSA neexistuje jednotný názor, u kterých věkových kategorií by se měl screening provádět. ACS („American Cancer Society“) doporučuje screening u všech mužů starších 50 let, naproti tomu mezinárodní studie ERSSPC („European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer) zahrnuje následující věkové skupiny :

pro Evropu 55-70 let

pro Kanadu 45-74 let

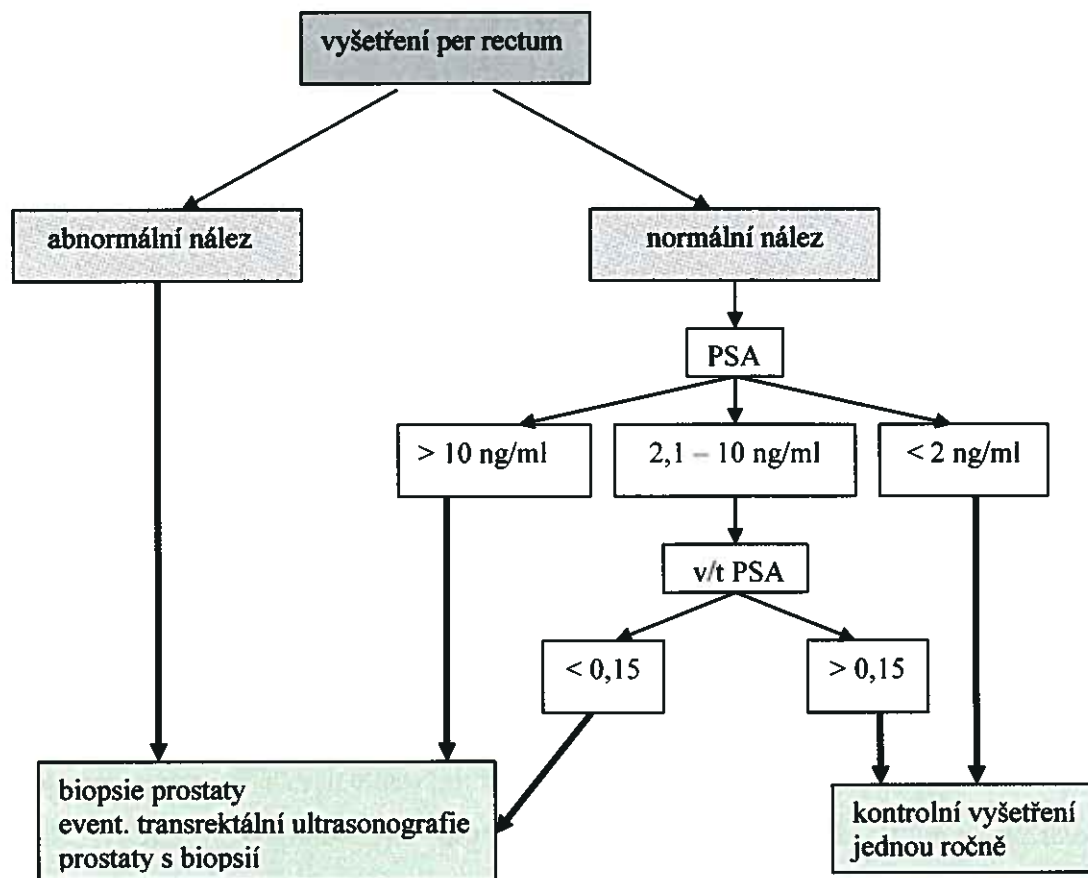
pro USA 60-74 let

V případě hereditární formy karcinomu prostaty (autosomálně dominantně dedičné onemocnění) je doporučován screening již od 40 let věku.

Bezpochyby nejmenší pravděpodobnost, že karcinom prostaty zůstane nepoznán, je při trojkombinaci těchto screeningových vyšetření :

- vyšetření per rectum
- stanovení specifického prostatického antigenu (PSA)
- transrektální ultrasonografické vyšetření prostaty (TRUS) s možností biopsie

Při vyšetření se doporučuje dodržovat základní algoritmus (Obr. 8), který zaručuje vysokou pravděpodobnost záchytu karcinomu prostaty.



Obr. 8 Algoritmus diagnózy karcinomu prostaty (12)

Je zřejmé, že screening vede k diagnóze zvýšeného počtu karcinomu prostaty a onemocnění nižšího stádia. Velmi často je rovněž diagnostikován latentní, klinicky nezávažný karcinom prostaty, který neohrožuje zdraví pacienta v průběhu zbývajících života a který není třeba léčit. Screening je tedy rovněž využíván k rozlišení klinicky závažného karcinomu prostaty, u něhož je nezbytná okamžitá léčba, a klinicky nezávažného karcinomu, jehož léčba není nutná (12).

4.2.2. PSA a detekce karcinomu prostaty

Rozlišení karcinomu prostaty a benigní hyperplazie prostaty

Úspěch onkologické terapie je téměř vždy závislý na včasné rozpoznání zhoubného tumoru a přesném stanovení diagnózy. Vyšetření sérové koncentrace PSA je běžně používanou metodou v diagnostice karcinomu prostaty. Přestože PSA v kombinaci s vyšetřením per rektum zlepšilo detekci karcinomu prostaty a včasnost diagnózy, je více než 40 % tumorů odhaleno až v lokálně pokročilém nebo metastatickém stadiu.

Největším problémem při stanovování sérové koncentrace PSA zůstává definovat hranici, nad kterou se hodnota PSA považuje již za zvýšenou. Diskriminační (referenční) hranice pro hodnocení zvýšené hladiny nádorových markerů při diagnostice primárního nádorového onemocnění je definována jako koncentrace, pod níž leží většina sérových hodnot zdravých lidí i nemocných s benigním onemocněním.

Čím níže tuto hranici stanovíme, tím vyšší senzitivity testu dosáhneme, avšak naopak za cenu nízké specifity. Pokud hranici pro normální hodnotu stanovíme příliš vysoko, pak specifita výrazně vzroste, avšak na úkor senzitivity.

Senzitivita nádorového markeru (správná pozitivita) udává pravděpodobnost, podle níž výsledek bude pozitivní, je-li nádor přítomen. Specifita (správná negativita) vyjadřuje pravděpodobnost negativního výsledku u lidí bez maligního onemocnění.

Hranice referenční hodnoty byla arbitrárně stanovena na mezinárodně uznávanou hodnotu 4 ng/ml; v současné době však s vědomím, že až 20 % pacientů s karcinomem prostaty má hladinu PSA nižší než 4 ng/ml. Dalším problémem je nízká specifita PSA při hodnotách 4,0-10,0 ng/ml. Hovoříme o tzv. diagnostické šedé zóně, ve které se karcinom prostaty vyskytuje pouze u 25 % všech vyšetřených pacientů (Obr. 9).

Senzitivita PSA je ve vztahu k detekci karcinomu prostaty uváděna mezi 68-80 % a specifita mezi 49-90 %. Hledaly a hledají se proto další způsoby, jak zvýšit senzitivitu a specifitu PSA vyšetření a zpřesnit tak diagnostiku karcinomu prostaty.

PSA	Pravděpodobnost karcinomu	% PSA	Pravděpodobnost karcinomu
2 ng/ml	1%	0-10%	56%
2-4 ng/ml	15%	10-15%	28%
4-10 ng/ml	25%	15-20%	20%
> 10 ng/ml	> 50%	20-25%	16%
		> 25%	8%

Obr. 9 Pravděpodobnost výskytu karcinomu prostaty v závislosti na sérových hodnotách PSA a fPSA
Muži s negativním vyšetřením per rectum, bez ohledu na věk (3)

Snahy o zlepšení senzitivity a specificity vyústily v hodnocení hladin PSA v různých souvislostech. Řadíme sem věkově specifický PSA, poměr volného a celkového PSA (f/t PSA), PSA denzitu (PSAD) a PSA velocitu (PSAV).

I. Volný PSA (fPSA – PSA free)

Zjištění, že PSA existuje v séru v několika různých molekulárních formách, a že koncentrace a poměr těchto forem se liší u maligních a benigních onemocnění, reprezentuje další významný pokrok v diagnostice časného, potenciálně kurabilního karcinomu prostaty a jeho odlišení od benigní hyperplazie prostaty. V případě benigního onemocnění je v séru vyšší podíl volné formy PSA. Důvodem by mohla být existence různých izoform enzymu. Izoelektrický bod molekul PSA nemocných s benigní hyperplazií prostaty leží v oblasti pH výrazně nižší než u nemocných s karcinomem prostaty, což by mohlo být způsobeno různým glykosylačním procesem PSA v dysplastických a maligních buňkách. Tento rozdíl by se mohl ve svém důsledku projevit rozdílnou vazbou PSA na alfa-1-antichymotrypsin event. alfa-2-makroglobulin.

II. Poměr volného a celkového PSA (f/t PSA)

Poměr volný/celkový prostatický specifický antigen (f/t PSA) je u pacientů s karcinomem prostaty signifikantně nižší, než u pacientů s benigní hyperplazií prostaty.

Určení hraniční hodnoty podílu volného PSA pro klinickou praxi je komplikováno částečnou závislostí podílu volného PSA na věku pacienta, velikosti prostaty a koncentraci celkového PSA. Je nutné také zdůraznit, že hraniční hodnoty volného PSA se liší, pokud jsou kombinovány různé metodiky vyšetření volného a celkového PSA od různých výrobců.

Catalona a kol. ve své studii zjišťovali procento volné frakce PSA při hodnotách PSA mezi 4,1 až 10,0 ng/ml a dospěli k závěru, že muži s karcinomem prostaty s normální nebo jen mírně zvětšenou prostatou mají nižší procento volného PSA než pacienti s benigní hyperplazií prostaty. Na základě Cohenovy studie pacientů s hodnotami volného PSA mezi hodnotami 2,5 až 10 ng/ml byla za fyziologickou stanovena hodnota více než 25% volného PSA při hladině celkového PSA mezi 4 až 10 ng/ml. Při těchto hodnotách je dosahováno 95% senzitivity a vyhneme se 20% zbytečných biopsií u pacientů bez karcinomu prostaty. Partin a kol. stanovili horní hranici normálního procenta volného PSA na 20% za předpokladu celkového PSA mezi 4 až 10 ng/ml, což mělo za následek ušetření 29% pacientů zbytečné punkce. Na základě těchto studií je patrné, že stanovení poměru volného PSA při hodnotách celkového PSA mezi 4 až 10 ng/ml zvyšuje specifitu detekce karcinomu prostaty v tzv. šedé zóně.

Někteří autoři ve svých studiích prokazují závislost resp. nepřímou úměru mezi poměrem f/t PSA a PSA. Muži s vyššími hladinami PSA mají nižší hodnoty poměru f/t PSA. Je zřejmé, že pacienti s nižšími hodnotami PSA by měli mít optimální hodnotu (cutpoint) poměru f/t PSA vyšší, než pacienti s vyššími hodnotami PSA. K potvrzení této hypotézy, a event. vytvoření serie „cutpointů“ pro různé hodnoty sérové koncentrace PSA, je třeba dalších studií.

III. PSA denzita (PSAD)

V roce 1990 poukázal Babaian jako první na význam sérové hladiny PSA ve vztahu k objemu prostaty a zavedl termín PSA denzita (PSAD); jde o poměr hodnoty celkového PSA (ng/ml) k objemu prostaty (cm^3). Senzitivita PSAD není příliš vysoká vzhledem k velké variabilitě ve výsledcích sonograficky měřeného objemu prostaty.

Seaman a kol. zjistili, že PSAD bylo u pacientů s karcinomem prostaty signifikantně vyšší oproti nemocným bez nálezu karcinomu prostaty. Pro rozlišení benigní hyperplazie a karcinomu prostaty doporučili rozhraní PSAD 0,15, které zlepšuje specifitu PSA až o 50 %. Později se však ve velké multicentrické studii (Catalona a kol.) prokázalo, že použití této hranice by sice vedlo ke snížení počtu provedených biopsií o více než 50 %, senzitivita vyšetření se však pohybuje jen okolo 52%, což způsobuje, že není detekováno až 50 % karcinomů prostaty. Tyto výsledky vedly některé autory k posunu hranice PSAD na 0,1, kdy dochází k redukci počtu biopsií o 24-42 %, ale není detekováno pouze 20 % karcinomů prostaty.

Zdá se tedy, že PSA denzita není vhodným diagnostickým testem, který by zpřesnil detekci karcinomu prostaty a který by dokázal zabránit zbytečnému provádění biopsií prostaty u pacientů, kteří mají sérovou koncentraci PSA mezi 4 a 10 ng/ml, normální vyšetření per rektum a nemají nádor prostaty.

Ve snaze zlepšit specifitu diagnostické metody se v poslední době soustředí pozornost na výpočet PSA denzity pouze tranzitorní (šedé) zóny.

IV. PSA denzita přechodné zóny (PSA – TZ)

Obdobně jako PSAD lze stanovit také parametr PSA-TZ (poměr PSA a objemu přechodné zóny). Přechodnou zónou je nazývána centrální oblast prostaty obkružující močovou trubici, odkud vychází benigní hyperplazie prostaty. Z této oblasti vychází pouze 10 až 15 % karcinomů prostaty.

Djavan a kol. v multicentrické studii uvádějí, že hodnoty f/t PSA (poměr volný/celkový PSA) a PSA-TZ byly nejsilnějšími parametry pro diferenciaci mezi benigní hyperplazií prostaty a karcinomem prostaty. Zároveň prokázali signifikantně nižší hodnoty PSAD a PSA-TZ u pacientů s větším objemem prostaty a tranzitorní zóny. U pacientů s hodnotou celkového PSA pod 10 ng/ml stanovili hraniční hodnotu PSA-TZ 0,35 při prediktivní hodnotě 74% zachycených karcinomů prostaty.

V. Věkově specifický PSA

Standardní referenční pásmo PSA je 0,0-4,0 ng/ml. Oesterling a kol. však již v roce 1993 poukázali na to, že horní hranice PSA by měla být stanovována v závislosti na věku vyšetřovaných pacientů (Tab. 5) . Celkový přírůstek PSA v celoplošné mužské populaci byl stanoven na 3,2 % za rok resp. 0,04 ng/ml/rok.

Tab. 5 Referenční hodnoty PSA pro různé věkové kategorie (9)

věk pacienta	referenční hodnoty PSA [ng/ml]
hodnoty stanovené Oesterlingem (95% specifita)	
40 – 49	0,00 – 2,5
50 – 59	0,00 – 3,5
60 – 69	0,00 – 4,5
70 – 79	0,00 – 6,5
hodnoty stanovené Andersonem	
40 – 49	0,00 – 1,5
50 – 59	0,00 – 2,5
60 – 69	0,00 – 4,5
70 – 79	0,00 – 7,5

VI. PSA velocita (PSAV)

PSA velocita vyjadřuje vzestup hladiny PSA v určitém časovém období;nejčastěji v časovém úseku 1,5 až 2 let.

V roce 1992 Carter a kol. publikovali možnost využití PSA velocity ke zlepšení detekce karcinomu prostaty; autor uvádí vyšší PSAV u mužů s karcinomem prostaty ve srovnání s muži bez karcinomu prostaty již 5 let před stanovením diagnózy.

Rychlost vzestupu PSA (PSAV) závisí na agresivitě tumoru. U zdravých jedinců je 0,04 ng/ml/rok, u pacientů s benigní hyperplazií prostaty je 0,07-0,27 ng/ml/rok a u pacientů s karcinomem prostaty je 0,75 ng/ml/rok a vyšší (72 % senzitivita, 95 % specifita). Podle Cartera pouze u 5 % mužů s hodnotou PSAV vyšší než 0,75 ng/ml/rok nebyl zachycen karcinom prostaty a 70 % mužů s diagnostikovaným karcinomem prostaty mělo hodnotu PSAV vyšší než 0,75 ng/ml/rok.

V současné době hlavní využití PSA velocity spočívá v možnosti detekce karcinomu prostaty při hladině PSA menší než 4,0 ng/ml, ve zlepšení indikačních kritérií pro opakované

biopsie prostaty při PSA vyšším než 4 ng/ml a rovněž k monitoringu výsledků radikální léčby karcinomu prostaty.

VII. Zdvojovací čas PSA (PSA doubling time – PSADT)

PSADT je čas, během kterého dojde ke zdvojnásobení koncentrace PSA v séru. Ve srovnání s PSA rychlostí je PSADT parametr nezávislý na původní hodnotě PSA.

Nádorové buňky se při recidivě karcinomu prostaty po radikální prostatektomii množí exponenciálně. Z toho plyne lineární závislost logaritmu PSA na čase. PSADT vypočteme tak, že dělíme přirozený logaritmus 2 směrnici přímky získané z grafu lineární závislosti logaritmu PSA na čase.

Zdá se, že pomocí PSADT lze rozlišit lokální recidivu od metastatického postižení pacientů po radikální prostatektomii, a tak ovlivnit léčbu a zpřesnit předpověď předpokládané délky života. PSADT bylo použito ve studiích, které se snažily odlišit recidivu po radikální prostatektomii od generalizace, a bylo zjištěno, že při metastatickém postižení byla průměrná hodnota PSADT 4,3 měsíce, zatímco při lokální recidivě se tato hodnota pohybovala okolo 11,7 měsíců.

Pound a kol. navrhli pro PSADT cut-off hodnotu 10 měsíců a uvádějí, že tato hranice nejlépe rozliší lokální recidivu od metastatického onemocnění po radikální prostatektomii. Na základě této hranice vytvořili algoritmus předpovídající pravděpodobnost vzniku metastatického postižení při biochemické relapsu po radikální prostatektomii.

Je zřejmé, že PSA doubling time hraje významnou roli při stanovení prognózy u pacientů po radikální prostatektomii (9).

4.2.3. RT – polymerázová řetězová reakce PSA (RT-PCR PSA)

Přestože screening s využitím PSA vedl ke vzestupu zachytu méně pokročilých stádií karcinomu prostaty, u jedné třetiny až poloviny pacientů podstupujících radikální prostatektomii pro lokalizovaný karcinom prostaty dojde k relapsu onemocnění.

Metoda RT-PCR představuje rychlou a citlivou metodu, sloužící ke zjištění generalizace prostatického karcinomu na základě identifikace jediné buňky produkující PSA v množství

jiných buněk (jedna PSA produkující buňka mezi 107 až 108 leukocyty). Metoda využívá reverzní transkriptázu k vytvoření kopií DNA ze všech mRNA transkriptů, následovanou PCR amplifikací tkáňově specifického genu pro PSA.

Několik na sobě nezávislých studií prokázalo, že výsledky vyšetření séra pomocí RT-PCR u pacientů s benigní hyperplazií prostaty jsou negativní, zatímco u pacientů s generalizovaným onemocněním jsou výsledky pozitivní.

Význam nálezů buněk exprimujících gen pro PSA v cirkulaci pomocí RT-PCR musí být dále detailně prozkoumán, neboť neexistuje důkaz o tom, že by jediná prostatická buňka cirkulující v krevním oběhu musela nutně být nositelem genetických změn vedoucích k vyšší invazivitě či k tvorbě vzdálených metastáz.

4.3. Budoucnost tumorových markerů v diagnostice karcinomu prostaty

PSA stále zůstává nejvýznamnějším tumorovým markerem při detekci a sledování karcinomu prostaty. Protože není markerem ideálním, existuje mnoho odvozených parametrů, které zlepšují jeho využití.

V nejbližší budoucnosti PSA zřejmě zůstane v běžné klinické praxi nejrozšířenějším markerem karcinomu prostaty, lze však očekávat prosazování dalších markerů. Mezi ně patří např. membránový antigen specifický pro prostatu, který byl popsán v roce 1987 Horoszewitzem a kol. Mezi nové slibné markery můžeme zařadit labeling index Ki-67, který je exprimován ve všech fázích buněčného cyklu kromě G₀ a je markerem buněčné proliferace. Ve vztahu ke karcinomu prostaty je intenzivně studován tumor supresorový gen p53. Bližší porozumění úloze angiogeneze u karcinomu prostaty vedlo ke studiím, které hodnotí mikrovaskulární denzitu (MVD) jako prognostický faktor karcinomu prostaty. Několik studií zjistilo přímou závislost mezi mírou MVD a patologickým stagingem karcinomu prostaty. Několik autorů použilo stanovení lidského glandulárního kallikreinu 2 (hK2) k odlišení pacientů s benigní hyperplazií prostaty od těch, kteří onemocněli karcinomem prostaty.

Nejnovějším markerem prostatického karcinomu je alfa-methylacyl CoA racemáza (AMACR). Známou imunohistochemickou pomůckou u diferenciální diagnostiky prostatického karcinomu jsou protilátky značící bazální vrstvu epitelu prostaty (34BE12, p63, cytokeratin 5/6); tyto metodiky mají však četná omezení (občas chybění v benigních carcinoma-like lézích jako jsou atrofie, postatrofická hyperplazie a adenosis). Protilátka AMACR (P504S), která je specifická pro karcinom a jen ojedinele a slabě pozitivní v benigních lézích, je o produktem poruchy AMACR genu, která se původně našla u pacientů s familiárním karcinomem prostaty. Následně byla vyrobena protilátka pro imunohistochemii a v různých studiích zaměřených na diagnosticky obtížné biopsie prostaty byla její specifická 79-100% a senzitivita 82-100%. Protilátka značí i vzácnější varianty prostatického karcinomu.

**5. HISTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ V DIAGNOSTICE
KARCINOMU PROSTATY**

PSA je jako tumorový marker vysoce specifický pro tkáň prostaty, avšak jeho specifita není 100%. Proto je určení hodnoty PSA jedním z řady stanovení, která se při podezření na maligní onemocnění prostaty provádějí, jeho vypovídací hodnota však získává na váze až v kontextu s výsledky dalších vyšetření.

Je-li u pacienta zaznamenán výrazný nárůst hodnoty PSA, nebo je-li po vyšetření per rectum odhalen abnormální nález, doporučuje se provedení biopsie prostaty, resp. transrektální ultrasonografie prostaty s případnou biopsií. Materiál pro vyšetření je rovněž možno získat při provedení transuretrální resekce prostaty.

Získaný materiál je podrobován histologickému vyšetření, během něhož je sledována přítomnost či nepřítomnost nádorových struktur, popř. stupeň diferenciací nádorových buněk a procentuální zastoupení nádorových buněk v daném vzorku tkáně.

5.1. Materiál pro vyšetření

I. Punkční biopsie

Vždy se zpracovává veškerý zaslaný materiál. Každá punkce se natahuje na zvláštní sklo a prokrojí se v dlouhých sériových řezech. Používá se základní HE barvení.

II. Transuretrální resekce

Pokud není klinické podezření na možnou nádorovou etiologii, zpracovává se většina materiálu (zhruba 2/3).

Existuje-li sebemenší klinické podezření na možné nádorové onemocnění, zpracovává se materiál celý (například jmenovitě vypsána suspekce na přítomnost karcinomu, vyšší PSA, metastázy neznámého původu, atd.).

5.2. Stanovení stagingu a gradingu

5.2.1. Staging

Jde o soubor hodnocení jednotlivých klinických příznaků, které charakterizují rozsah nádoru.

a) Klinická klasifikace

TX - primární tumor nemůže být posouzen

TO - primární tumor není detekován

T 1 - klinicky nedetekovatelný tumor (nepalpovatelný a nezobrazitelný žádnou metodou)

T1a - tumor je nalezen náhodně histologicky, tvoří méně než 5% tkáně

T1b - tumor je nalezen náhodně histologicky, tvoří více než 5% tkáně

T1c - tumor byl nalezen v punkční biopsii

T 2 - tumor přítomen pouze v prostatě : T2a - tumor infiltruje jeden lalok

T2b - tumor infiltruje oba laloky

T 3 - tumor přerůstá pouzdro prostaty : T3a - tumor přerůstá přes pouzdro

T3b - tumor přerůstá do semenných váčků

T 4 - tumor je fixován či infiltruje další okolní struktury (mimo semenných váčků)

b) Patologická klasifikace

pT2 - tumor omezen na prostatu : pT2a - infiltrace 1 laloku

pT2b - infiltrace obou laloků

pT3 - extenze mimo prostatu : pT3a - tumor roste přes pouzdro prostaty

pT3b - invaze do semenných váčků

pT4 - invaze do močového měchýře a rekta

c) Posouzení stavu regionálních uzlin

NX - regionální lymfatické uzliny nemohou být posouzeny

NO - bez metastáz v regionálních uzlinách

N 1 - metastáza či metastázy v regionálních lymfatických uzlinách

d) Vzdálené metastázy

MX - vzdálené metastázy nemohou být posouzeny

MO - bez vzdálených metastáz

M 1 - vzdálené metastázy : M1a - lymfatické uzliny (kromě regionálních)

M1b - kost

M1c - jiné lokalizace

5.2.2. Grading

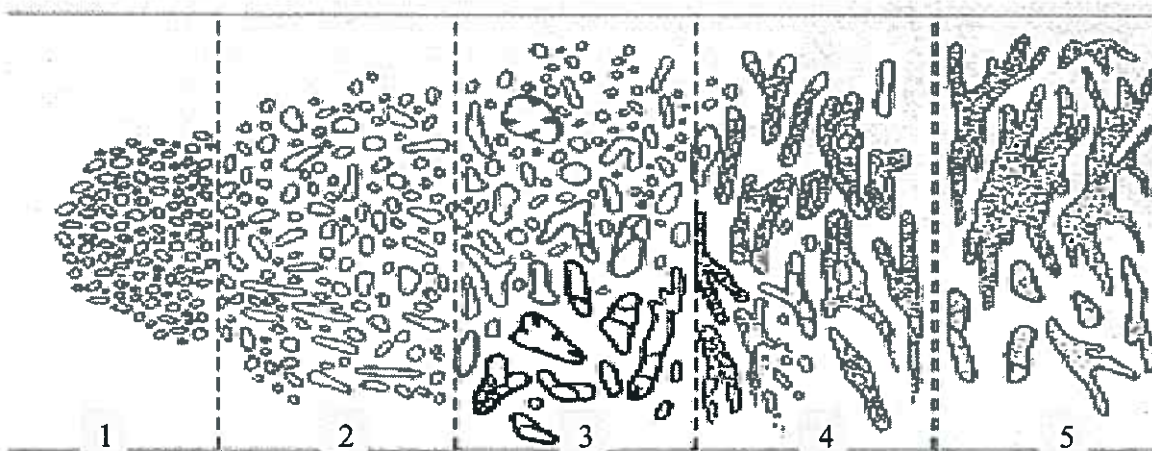
Grading je označení pro hodnocení stupně zralosti buněk nádorového ložiska. Uznávaným a všeobecně užívaným typem hodnocení je tzv. Gleasonské skóre, které vychází z určení stupně diferenciacce buněk ve dvou největších nádorových ložiscích sledované tkáně. Každé z těchto ložisek je ohodnoceno číselně (Obr. 10), součet obou čísel pak udává hodnotu Gleasonského skóre, na jehož základě se rozlišují 4 stádia nádorů prostaty :

G₁ : Gleasonské skóre 2 – 4, dobře diferencovaný tumor

G₂ : Gleasonské skóre 5 – 6, středně diferencovaný tumor

G₃ : Gleasonské skóre 7, středně až špatně diferencovaný tumor

G₄ : Gleasonské skóre 8 – 10, špatně diferencovaný tumor



Obr. 10 Diferenciace buněk pro hodnocení Gleasonského skóre

5.3. Detekce bazálních buněk

Prostata se skládá ze stromatu (vazivo, hladká svalovina) a žlázek. Žlásky mají nepravidelný tvar, často s drobnými papilami. Výstelka je tvořena nízce kolumnárními buňkami se světlou cytoplasmou a pravidelnými, okrouhlými jádry (jsou malá, nejasně

definovaná). Zevně od této vrstvy se nachází vrstva bazálních buněk přibližně kuboidálního tvaru.

Vrstva bazálních buněk je pozitivní na vysokomolekulární (HMW) cytokeratin. Jedná se o intermediální filamentární cytoskeletální protein nezbytný pro vývoj a diferenciaci epiteliálních buněk. Reakce s monoklonální anti-HMW cytokeratinovou protilátkou má zásadní diagnostický přínos: v nádorových žlázkách (zpravidla) chybí, ve většině benigních proliferací je přítomna. O'Malley pozoroval pozitivní zbarvení bazálních buněk u 47 případů benigních prostatických lézí (aplazie, fibroepiteliální uzol, postsklerotická hyperplazie, hyperplazie bazálních buněk, ..), zatímco 21 případů drobných acinární adenokarcinomů nevykazovalo žádnou reaktivitu (16).

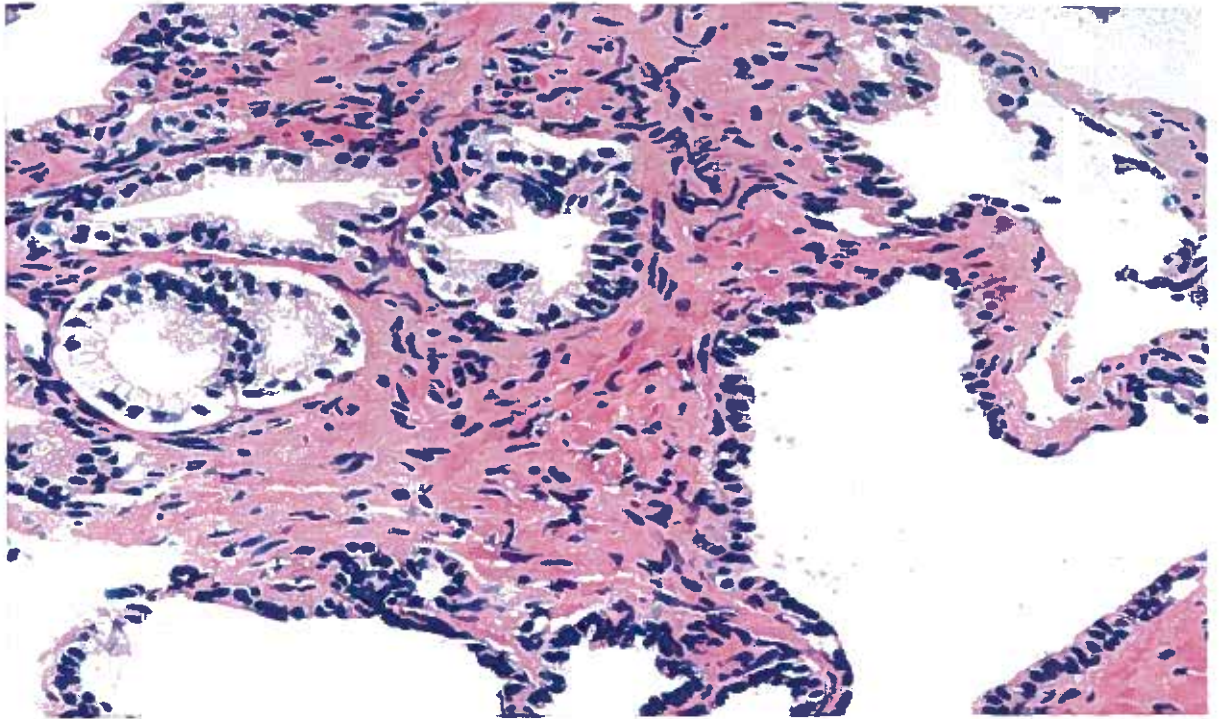
5.4. Histologická analýza

Na pěti vzorcích prostatické tkáně budou demonstrovány některé typické nálezy získané při histologickém vyšetření. Ke sledování byl použit mikroskop Olympus AX 70 (Olympus, Japan).

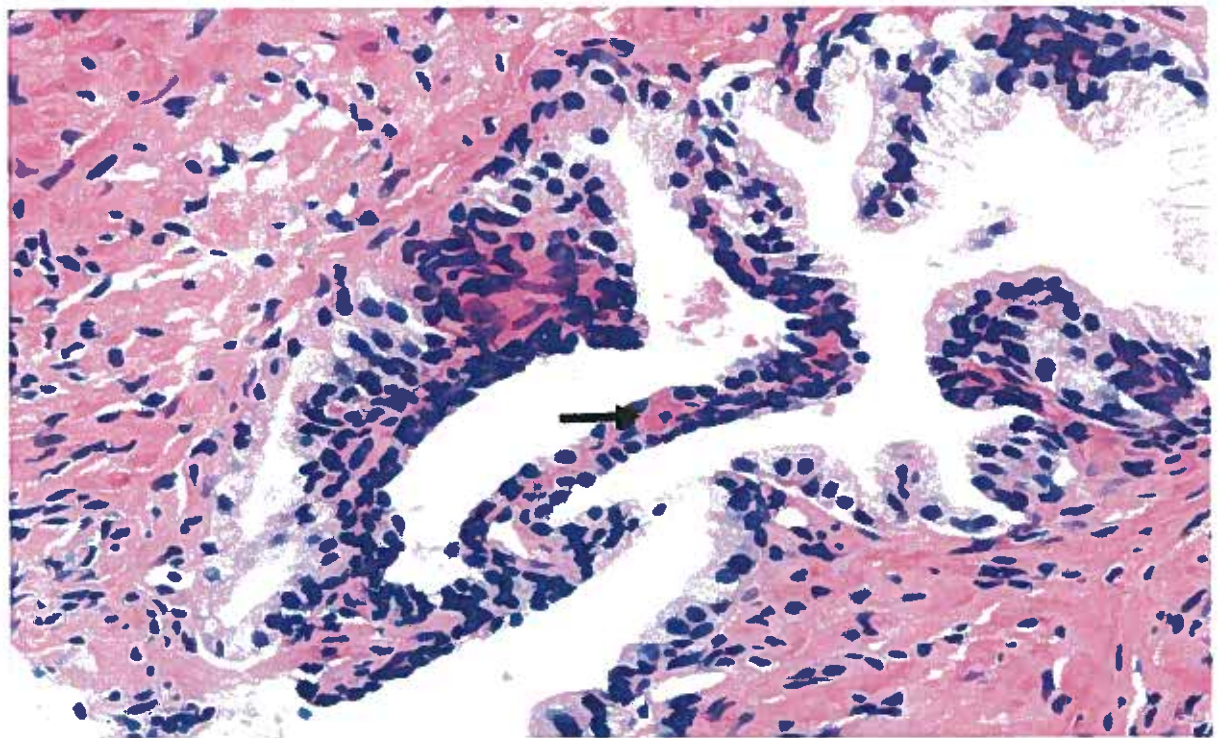
1) Pacient č. 1

- věk 69 let, k analýze byl odeslán vzorek tkáně získané jehlovou biopsií

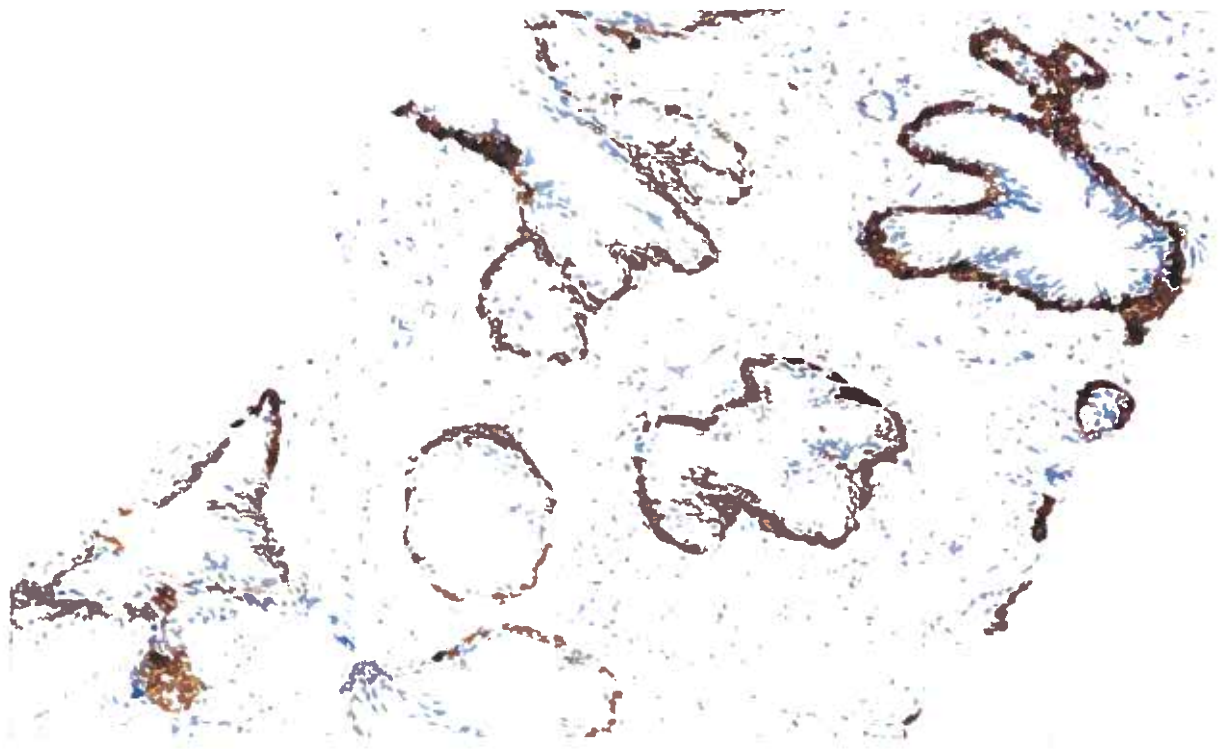
Nález : V prouzcích prostatické tkáně z punkční biopsie prostaty byla zastižena mírná hyperplazie prostaty a normální acinární prostatické žlásky (Obr. 11). Mikroacinárně uspořádaný adenokarcinom (Gleasonské skóre 5) zaujímá v preparátu méně než 10% vyšetřované tkáně; neobjevuje se polymorfie jader, v některých jádrech je možno zaznamenat probíhající mitózu (Obr. 12). HMW vyšetření prokázalo bazální buňky (Obr. 13, 14). Daný nález je možno pokládat za normální.



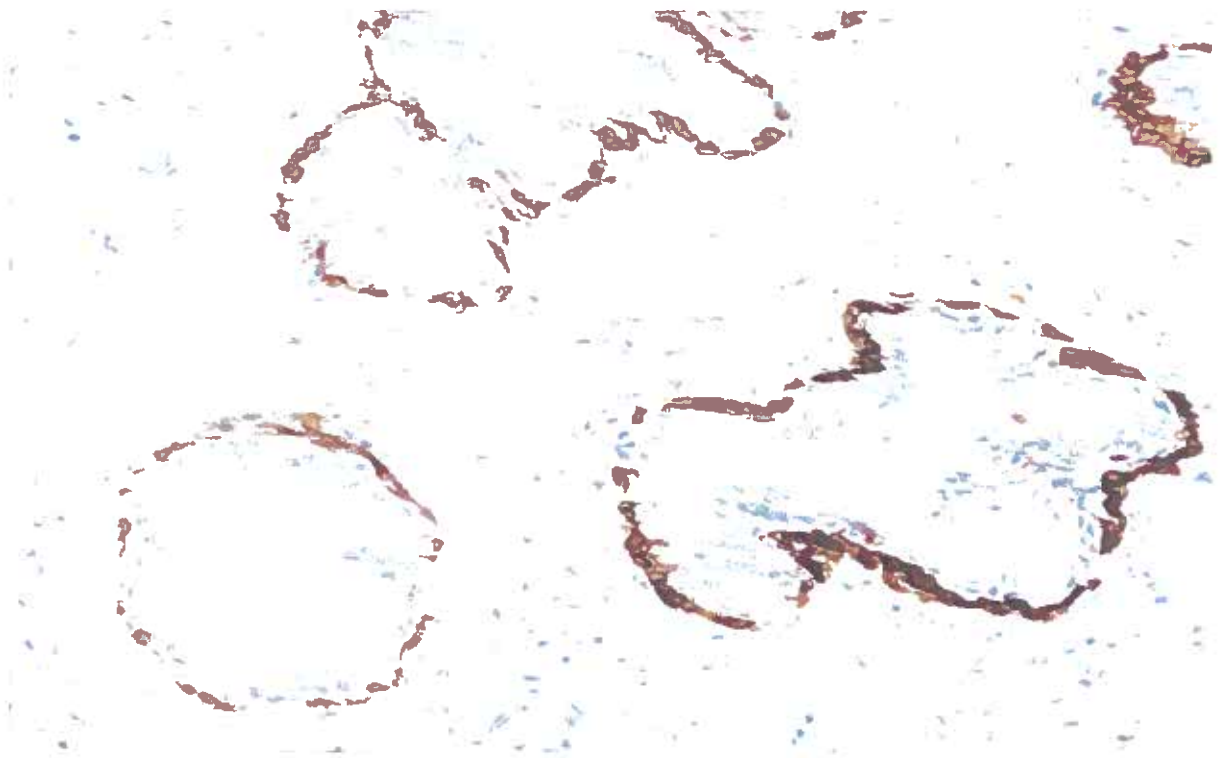
Obr. 11 (zvětšeno 200×)



Obr. 12 (zvětšeno 200×)



Obr. 13 (zvětšeno 100×)

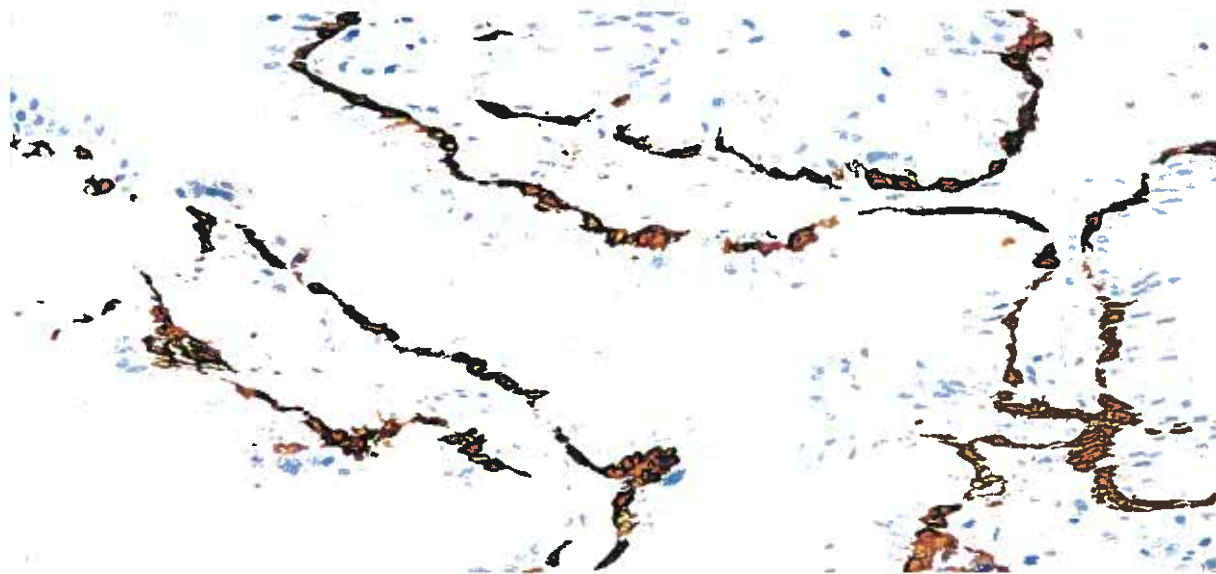


Obr. 14 (zvětšeno 200×)

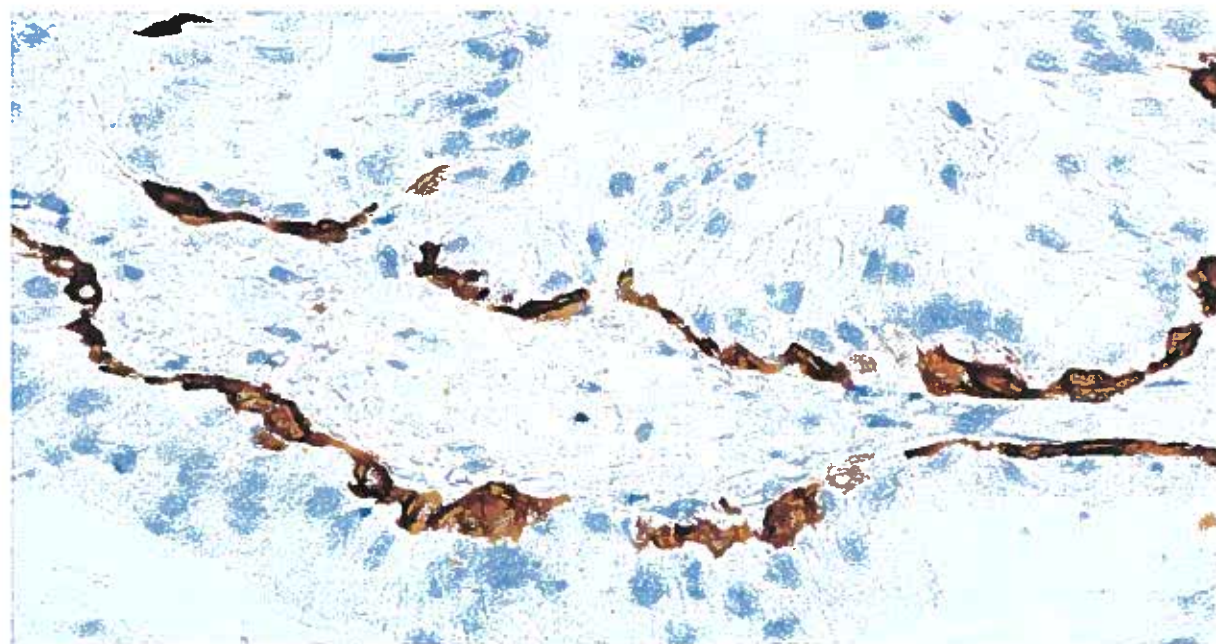
2) Pacient č. 2

- věk 64 let, k analýze byl odeslán vzorek tkáně získané jehlovou biopsií

Nález : V prouzcích jehlové biopsie jsou známky myoadenomatózní hyperplazie prostaty, přesvědčivé maligní nádorové struktury nebyly zjištěny. Všechny žlázy mají v imunohistochemické reakci HMW přítomny zřetelně zbarvené bazální buňky (Obr. 15,16).



Obr. 15 (zvětšeno 200×)

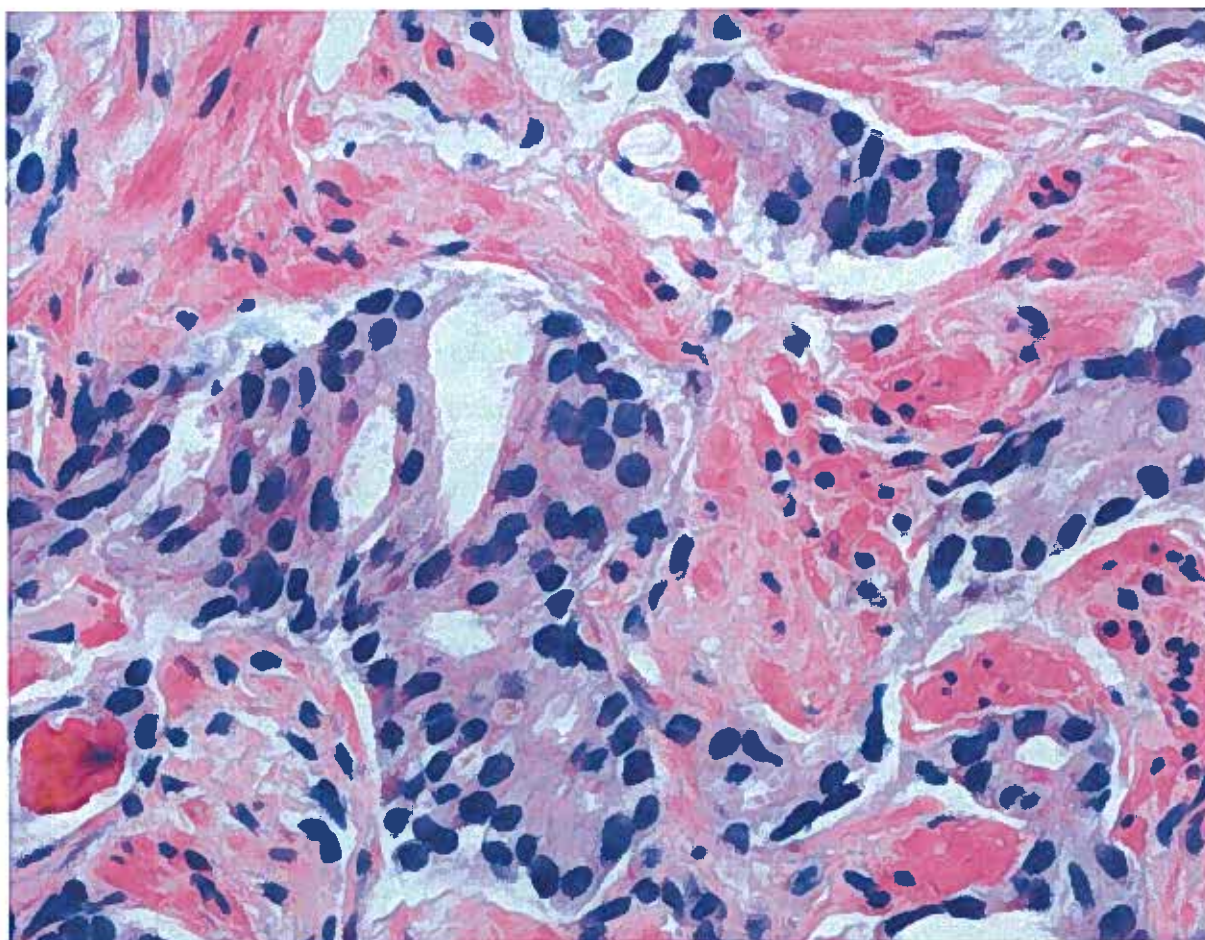


Obr. 16 (zvětšeno 400×)

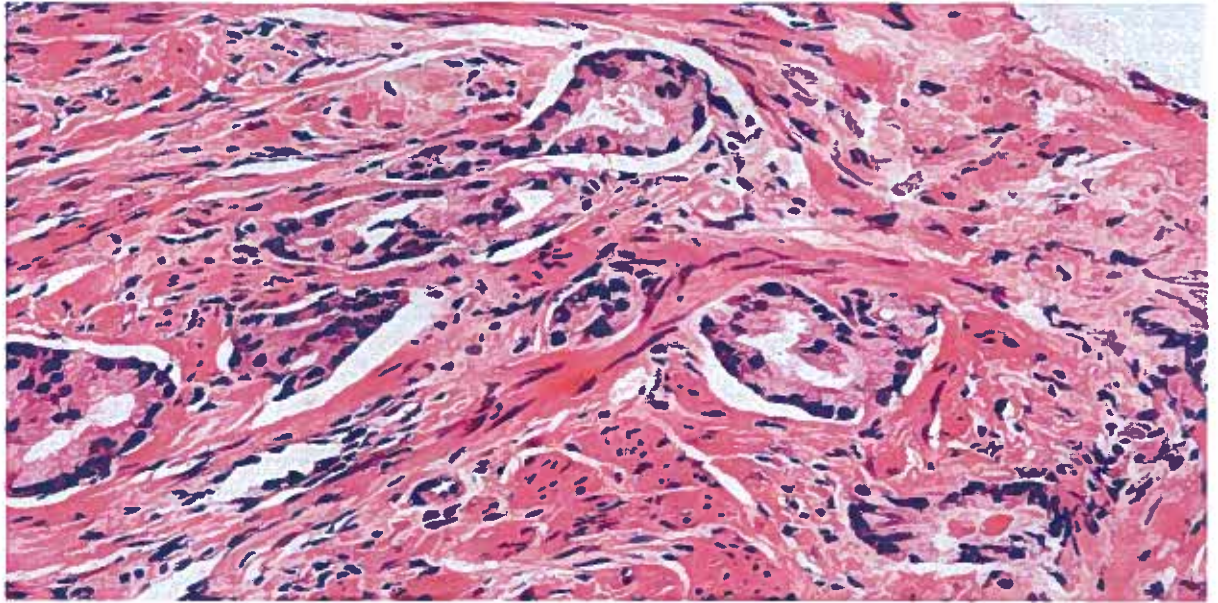
3) Pacient č. 3

- věk 74 let, k analýze byl odeslán vzorek tkáně získané jehlovou biopsií

Nález : Mikroskopicky kromě myoadenomatózní hyperplazie prostaty (Obr. 17) zastiženo ložisko středně diferencovaného mikroacinárně uspořádaného adenokarcinomu. Hodnota Gleasonského skóre byla stanovena součtem 3+4=7 (Obr. 18). Nádorem je postiženo přibližně 20% vyšetřované tkáně. HMW vyšetření v inkriminovaném ložisku neprokázalo přítomnost bazálních buněk.



Obr. 17 (zvětšeno 200×)

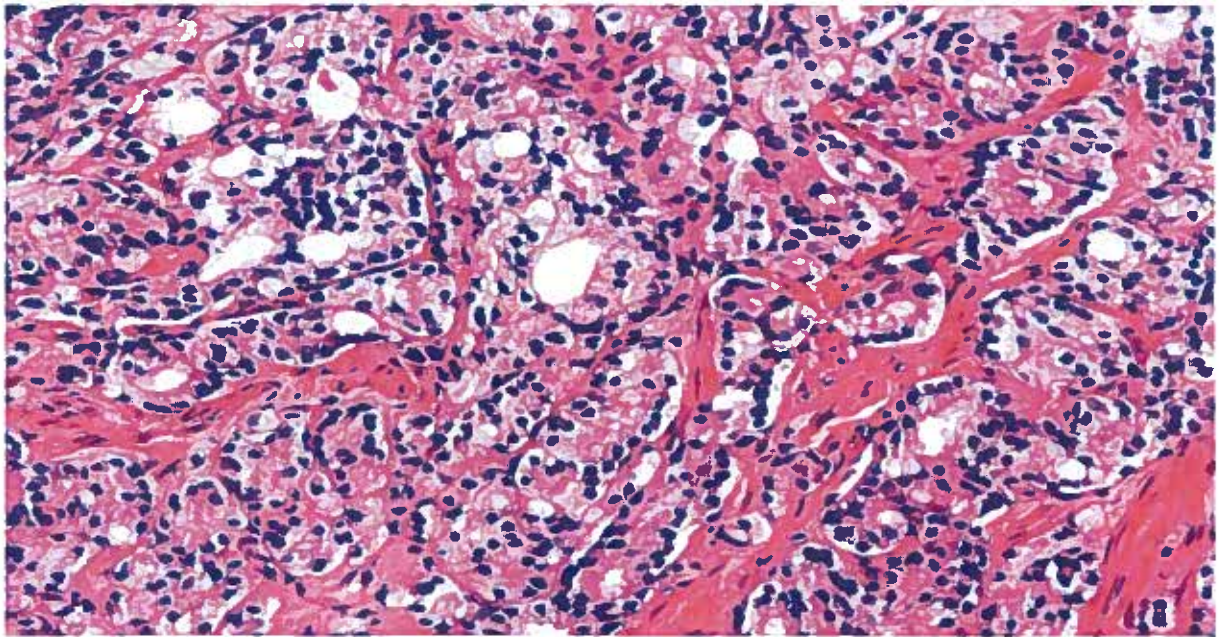


Obr. 18 (zvětšeno 200×)

4) Pacient č. 4

- věk 81 let, analýze byl odeslán vzorek tkáně získané jehlovou biopsií

Nález : Mikroskopicky zastižen středně diferencovaný prostatický adenokarcinom, převážně mikroacinárně uspořádaný, Gleasonské skóre 7 (Obr. 19).

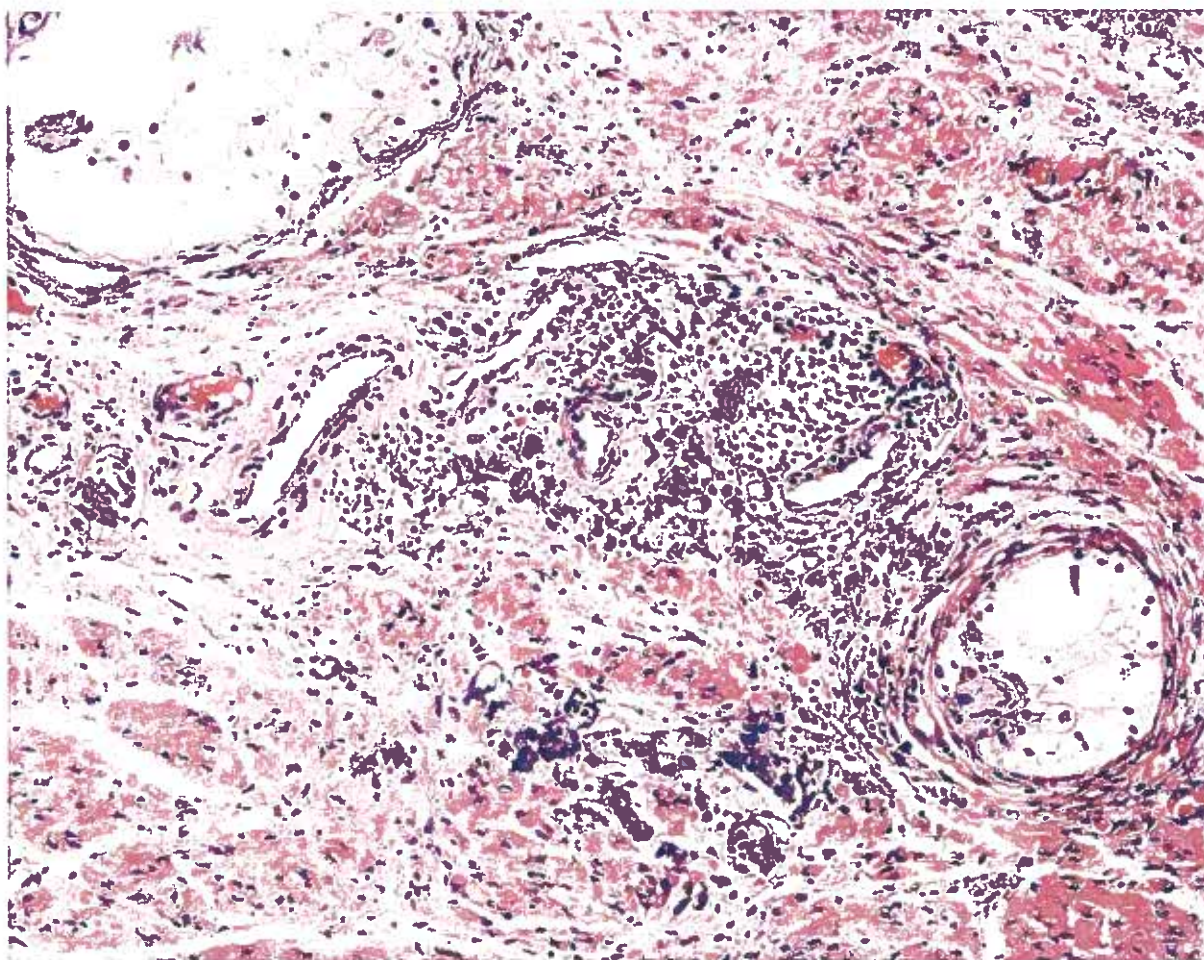


Obr 19 (zvětšeno 200×)

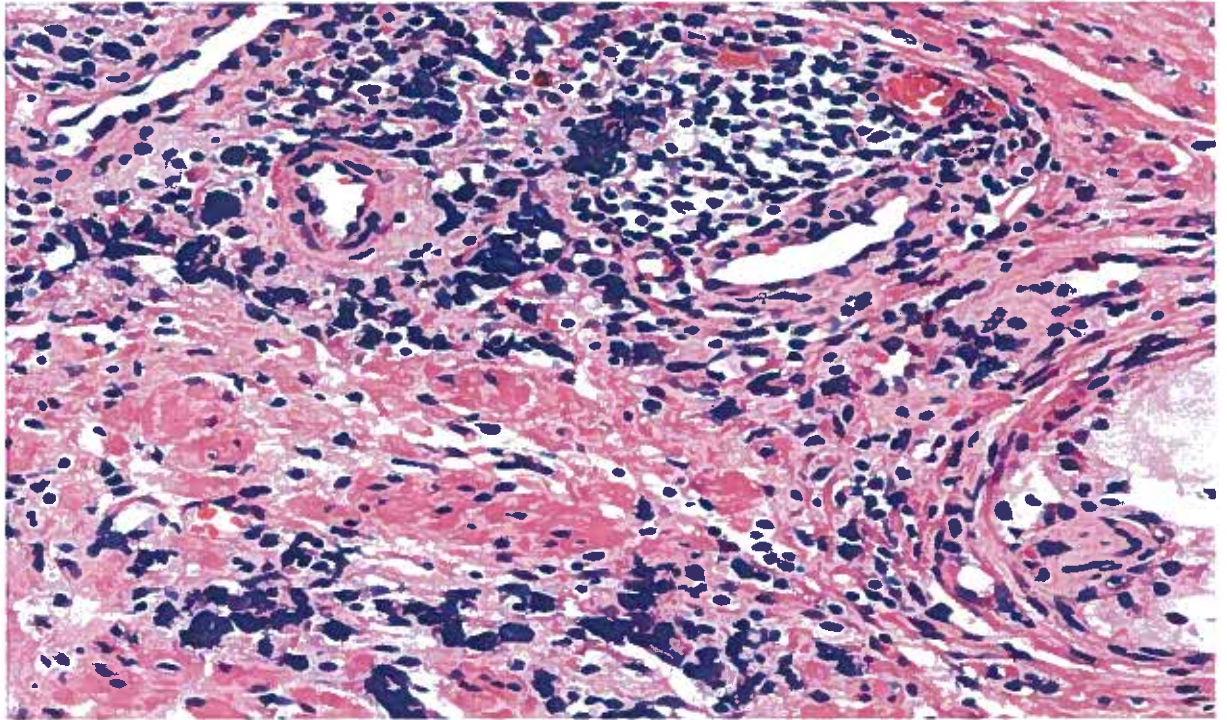
5) Pacient č. 5

- věk 70 let, materiál k analýze získán transuretrální resekci prostaty, k mikroskopování bylo připraveno větší množství hrubších tkáňových řízků prostaty

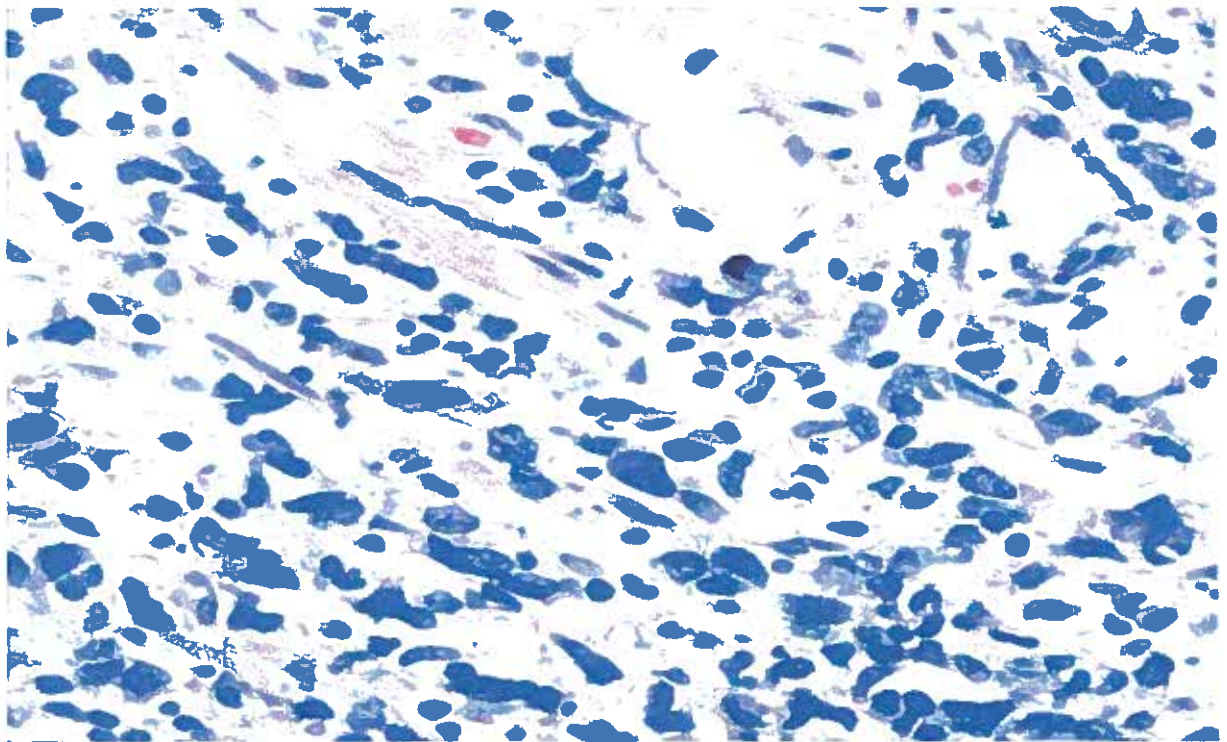
Nález : Sledovaná tkáň je prostoupena intenzivně rostoucím adenokarcinomem (Obr. 20), který je místy disociovaný a penetruje do svalové tkáně (Obr. 21); Gleasonské skóre 10. Na detailu je zřetelně patrná polymorfie jader nádorového infiltrátu (Obr. 22).



Obr. 20 (zvětšeno 100×)



Obr. 21 (zvětšeno 200×)



Obr. 22 (zvětšeno 400×)

6. DISKUZE

Zhoubné novotvary patří hned po onemocnění kardiovaskulárního ústrojí k nejčastějším příčinám úmrtí ve všech civilizovaných státech. Mortalita způsobená výskytem maligního onemocnění vzrostla ze 4% v roce 1909 na více než 20% v devadesátých letech. Tato tendence vedla k rozvoji nových diagnostických metod, jejichž hlavním cílem je odhalení přítomnosti nádorového bujení v organismu v jeho počátečních stádiích. Včasný záchyt onemocnění totiž zvyšuje pravděpodobnost účinnosti léčby a zlepšuje prognózu daného onemocnění.

Mimo klasických zobrazovacích metod, které jsou v diagnostice nádorů již tradičně využívány, se velmi výrazně rozvíjí oblast laboratorních stanovení nádorového růstu. Základem těchto testů je stanovení koncentrace tzv. tumorových markerů, což jsou látky vznikající v organismu ve zvýšené míře v důsledku přítomnosti a vývoje maligního procesu. Tyto látky je možné zachytit a stanovit v tělních tekutinách (krev, krevní sérum), popř. s využitím imunohistochemických metod v barvených preparátech vyšetřované tkáně.

K nejčastěji používaným a nejrozšířenějším metodám stanovení nádorových markerů patří základní imunochemické testy, které určují marker jako antigen. K jeho zachycení je tedy využita specifická protilátka, která, je-li přidávána ve známém množství, umožňuje i kvantifikaci nádorového markeru. Protilátka je značena enzymem nebo radioaktivním izotopem, což umožňuje konečnou detekci vznikajícího komplexu tumorového antigenu s protilátkou v automatickém analyzátoru.

Tento typ stanovení je relativně levnou metodou s poměrně slušnou výtěžností, jeho nevýhodou je však nižší citlivost při nízkých koncentracích nádorového markeru, kdy není stanovení dostatečně průkazné.

V případě užití detekčního systému s radioaktivním izotopem je nutné pracovat se zvýšenou opatrností a postupovat dle předepsaných norem, které mimo jiné uvádějí i způsob likvidace nebezpečného radioaktivního odpadu, což může být pro některá zdravotnická zařízení ekonomicky zatěžující.

Nejnovější metody stanovení tumorových markerů vycházejí z poznatků molekulární biologie. Jejich základem je stanovení numerických odchylek přímo v genomu podezřelé buňky. Nespornou výhodou této metody je odhalení maligní změny buňky již na úrovni

genomu, což umožňuje zachycení nádorových změn u velmi malého počtu buněk, které ještě nepředstavují solidní nádorové ložisko.

V porovnání s imunochemickými metodami jsou metody molekulární biologie citlivější, jsou však výrazně finančně náročné. Vyžadují nejen speciální analytické vybavení, ale i velmi zkušený personál, neboť práce s genetickým materiálem je značně náchylná k chybám způsobeným v preanalytické fázi přípravy vzorku.

Z tohoto důvodu jsou molekulárně-biologické metody využívány spíše na pracovištích větších oblastních či spíše fakultních nemocnic, kde jsou prováděny patřičně vyškoleným personálem.

Histologické vyšetření podezřelých tkání je prováděno technikou ultratenkých řezů fixovaných nejčastěji formaldehydem. Mikroskopické vyšetření pak prokazuje přítomnost tvarově atypických jader, buněk či celých buněčných struktur. Dalším rozšířením této metody je detekce antigenních struktur v tkáňovém řezu s využitím barvení pomocí specifických protilátek.

Tyto metody umožňují nejen rozlišení mezi benigní či maligní etiologií onemocnění, ale i určení původu případného nádoru. Jejich nevýhodou je nutnost invazivního zákroku při odběru materiálu pro vyšetření a relativně delší doba nezbytná pro přípravu preparátu pro mikroskopické stanovení.

Kombinací klasického histologického postupu s metodami molekulární biologie vzniká jeden z nejmodernějších postupů pro stanovení přítomnosti nádorového bujení v organismu, technika tkáňové mikroarray. Výhodou je možnost získat řadu velmi cenných informací o patologii nemoci, její progresi či rezistenci na terapii.

Z hlediska přístrojového vybavení a odbornosti obsluhujícího personálu jde o metodu vysoce finančně nákladnou, která je využívána zatím spíše pro vědecké či studijní účely.

7. ZÁVĚR

Stanovení tumorových markerů laboratorními metodami je v současné době poměrně rozšířeným postupem, který však nelze pokládat u většiny markerů za diagnostický, neboť sama přítomnost nádorového markeru v organismu nemusí signalizovat výskyt maligního onemocnění. Zvýšené hodnoty nacházíme u některých pacientů i za fyziologických podmínek či při výskytu benigního onemocnění. Proto je nutné chápat stanovení tumorových markerů spíše jak doplňkové vyšetření, které může být použito pro potvrzení diagnózy určené jinými metodami.

Vzhledem ke snaze o záchyt nádorového onemocnění v jeho počátečních stádiích se uvažovalo o zavedení tumorových markerů jako screeningových faktorů, avšak u většiny z nich (s výjimkou PSA) je jejich specifčnost pro maligní onemocnění konkrétní lokalizace příliš nízká.

Hlavní těžiště využití tumorových markerů spočívá ve stanovení jejich hladiny před začátkem terapie a ve sledování změn koncentrace markeru po proběhlém léčebném cyklu. Trvalý pokles koncentrace pak lze považovat za pozitivní signál vzhledem k prognóze onemocnění. Naopak stálý nárůst koncentrace tumorového markeru pravděpodobně svědčí o neúspěšnosti terapie nebo relapsu onemocnění. V případě návratu onemocnění upozorňuje rostoucí hladina tumorového markeru na opětovnou přítomnost nádorových buněk v organismu několik měsíců před prvními klinickými příznaky. Tato vlastnost nádorových markerů je využívána pro časný záchyt relapsu onemocnění, díky němuž je včas zahájena terapie a prognóza pacienta se zlepšuje.

8. SEZNAM LITERATURY

1. Alberts a kol. :

Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie buňky. Ústí nad Labem, Espero Publ., 2000, s. 313 – 343

2. Doležalová V., Komárek V., Parák T., Pospíšilová V., Novotná H. :

Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii. Brno, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 185 – 239

3. Duffy M.J. :

PSA as a marker for prostate cancer : a critical review. Ann. Clinical Biochemistry, 1996 , s. 511 – 519

4. Eckschlager T., Průša R. :

Laboratorní vyšetření v onkologii. Praha, Triton, 2002, s. 58 – 126

5. Gomolčák P. :

Základy imunohistochemie v patologii. Brno, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1997, s. 7 – 22

6. Kapustová M., Krejčí E. :

Nádorové markery přeceněné i nedoceněné (malé kazuistické repetitorium nádorových markerů). Labor Aktuell 2/2005, Praha, Roche Diagnostics, s. 19 – 21

7. Maňáková E., Seichertová A. :

Metody v histologii. Praha, Karolinum, 2001, s. 7 – 33

8. Masopust J. :

Nádorové markery včera, dnes a zítra.

1. část. Labor Aktuell 2/2004, Praha, Roche Diagnostics, s. 4 – 8

2. část. Labor Aktuell 3/2004, Praha, Roche Diagnostics, s. 7 – 9

3. část. Labor Aktuell 4/2004, Praha, Roche Diagnostics, s. 4 – 9

9. Pešl M., Zámečník L., Soukup V., Dvořáček J. :

Prostatický specifický antigen a odvozené parametry. Urologie pro praxi 2/2004, Olomouc, Solen s.r.o., s. 59 – 63

10. Racek J. :

Klinická biochemie. Praha, Karolinum, 1999, s. 231 – 241

11. Rejthar A., Vojtěšek B. :

Obecná patologie nádorového růstu. Praha, Grada, 2002, s. 32 – 104

12. Sabra R., Douda P., Hyrší L., Ptáček V. :

Karcinom prostaty do roku 2000. Praha, Maxdorf s.r.o., 1996, s. 9 – 50

13. Šimíčková M. :

Doporučení pro vyšetřování nádorových markerů : European Group on tumor markers (EGTM) 1999. Labor Aktuell Czech 3, 2001, s. 4 – 7

14. Vacek Z. :

Histologie a histologická technika. Brno, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1996, s. 25 – 79

15. Zima T. :

Laboratorní diagnostika. Praha, Galén, 2002, s. 331 – 340

16. O'Malley F.P., Grignon D.J., Shum D.T. :

Usefulness of immunoperoxidase staining with high-molecular-weight-cytokeratin in the differential diagnosis of the prostate gland. *Virch Arch Patol Anat* 1990, s. 417