

NÁDOROVÉ MARKERY

J. Masopust

(Ústav klinické biochemie a patobiochemie,
2. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze)

„Rakovina“ (nádorové onemocnění) je stará jako život sám; byly nalezeny známky proběhlých mozkových nádorů *u pravěkých lidí* nebo projevy zhoubného nádoru prsu na 5000 let staré *egyptské mumii*.

Staré Řecko v osobě lékaře Hippokrata dalo rakovině její název (v latinském překladu)

CANCER

„Rakovina“ = Zhoubný nádor

Dnes: **nádorové onemocnění** (200 druhů)

2. nejčastější příčina úmrtí (nejvyspělejší země)

rok 2000: 10 milionů nových případů/rok (6 milionů úmrtí)

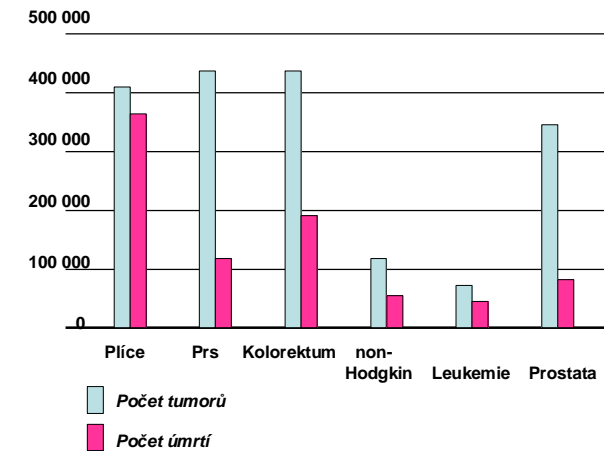
rok 2020: 15 milionů

Životní styl (kouření, strava, nadváha): **plice, střevo**

Genetika: **prs**

Viry: **játra, děložní čípek**

*(30 % mužů nad 65 let má karcinom prostaty;
ale jen 3 % na to umírá)*



„Boj proti rakovině“ spočívá v :

- prevenci (životní styl)
- odhalení rizika
- časné diagnóze
- cílené terapii
- monitorování průběhu onemocnění a účinnosti terapie
- časném odhalení reziduální choroby

Genomika
Proteomika
Transkriptomika
Operomika
Metabolomika

Integrovaná věda:

- * klinika
- mol. biologie
- genetika
- patologie
- biochemie
- zobr.techn.
- farmakologie
- epidemiologie
- bioinformatika

Laboratorní průkaz nádorového onemocnění se datuje od poloviny 19. století, kdy ve střední Evropě vznikl obor klinické chemie

Bence Jonesova bílkovina v moči

Průkaz krystalků kyseliny močové
na bavlněném vlákne ponořeném do séra
pacienta s chronickou leukemií

Laboratorní testy používané v 50. letech u nás

Brdičkova polarografická reakce

Sáblíkuv komplex laboratorních testů

Paraproteiny
(Krevní obraz, FW, okult.krvácení)

Starší definice

Nádorové markery

jsou laboratorně prokazatelné známky, kterými se **nádorové onemocnění projevuje**

Novější definice

Nádorové markery

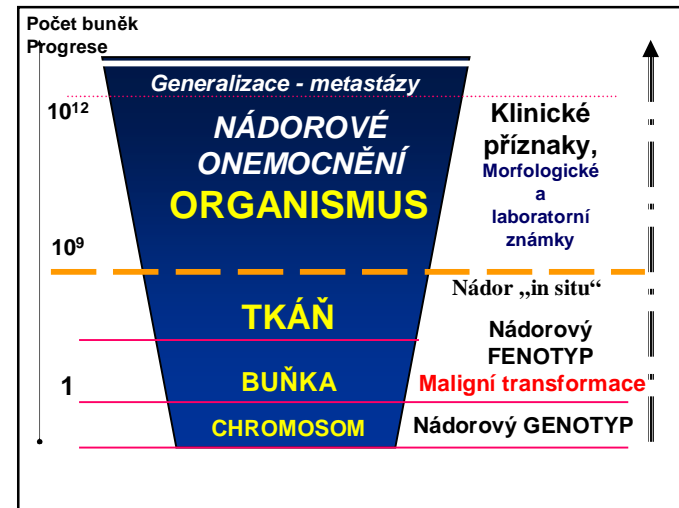
jsou laboratorně prokazatelné známky v biologických tekutinách nebo v tkáních, pomocí kterých je možno prokázat :

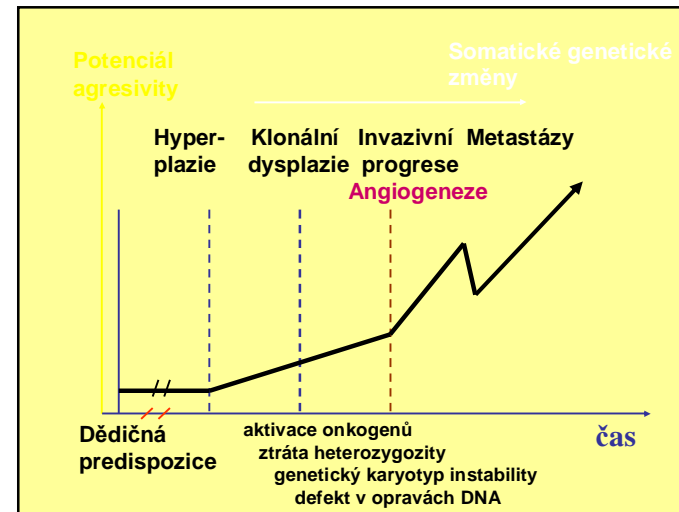
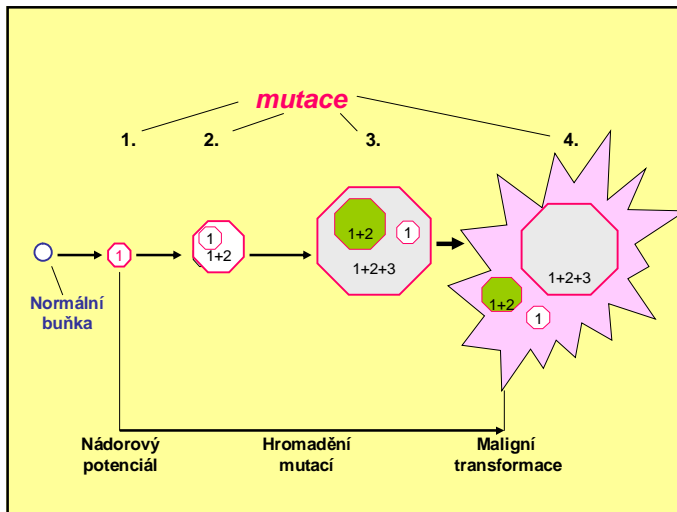
- riziko vzniku
- přítomnost
- prognózu
- účinnost (neúčinnost) terapie nádorového onemocnění

Ideální tumorový marker,
který by s jistotou prokázal buď
přítomnost nebo naopak nepřítomnost
maligního nádoru (v samých začátcích)
neexistuje

MALIGNÍ TUMOR je *genetické onemocnění*

Přechod normální tkáně do stavu invazivní nádorové choroby *trvá* obvykle **5 – 20 let**
Ovlivňují to *hereditární genetické faktory* a *somatické genetické změny*
Progresi podporuje postupné (!) hromadění genetických změn ↘
nekontrolovaný růst způsobený kupř.:
- *trvalou aktivací signální transdukce* růstového stimulu
- *alterací kritických bodů* buněčného cyklu
- *deregulací DNA-transkripčních faktorů*





NÁDOROVÝ GENOTYP

výsledek nahromadění *mutací (alterací)*

genů pro řízení

* **proliferace**

* **diferenciace**

* **zániku**

BUNĚK

POPULACI možno rozdělit na 4 genetické ONKODÉMY

(dle vztahu vývoje nádoru ke genetické nebo environmentální zátěži)

(1) ZÁKLADNÍ - normální populace kde riziko nádorového onemocnění vzniká nahromaděním bodových mutací

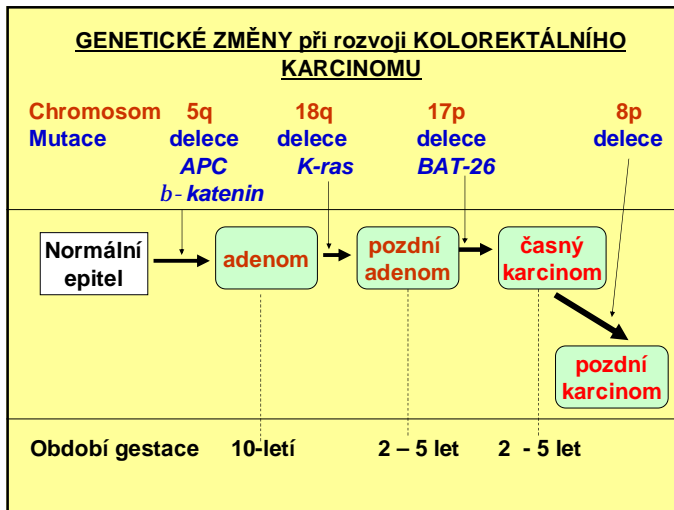
(2) ENVIROMENTÁLNÍ - část normální populace kde riziko se zvyšuje působením okolních podmínek (chemie, radiace, viry)

(3) ENVIROMENTÁLNĚ GENETICKÁ - část populace se zvýšenou náchylností k environmentálním kancerogenům

(4) GENETICKÁ - část populace s geneticky přenosným rizikem

"Rakovina je genetická porucha somatických buněk: maligní tumory obsahují buňky nesoucí mutace nebo delece kritických nádorových genů"

"Mutace zárodečných buněk přenáší náchylnost k nádorovému onemocnění z rodičů na děti"



KLASIFIKACE TUMOROVÝCH MARKERU

A. Nádorem tvořené

-Antigeny

- * onkofetální (AFP, CEA ..)
- * onkoplacentární (hCG, isoenzymy ALP)
- * „Carcinoma antigens“ (CA-19-9, CA 15-3..)
- * paraproteiny

-Hormony (kalcitonin, katecholaminy..)

-Enzymy (NSE ..) -(Receptory hormonů)

B. S nádorem sdružené (CRP, okult.krvácení..)

C. Onkogeny a antionkogeny (BRCA1, p53..)

D. Faktory transdukce signálu (HER2/neu, ..)

Význam stanovení tumorových markerů

* monitorování terapie

* včasné rozpoznání recidivy

* hodnocení prognózy

(určení proliferační rychlosti)

• určení rizika (onkogeny a antionkogeny a jejich produkty)

• určení specifické (individuální) terapie

* diferenciální diagnostika

* screening

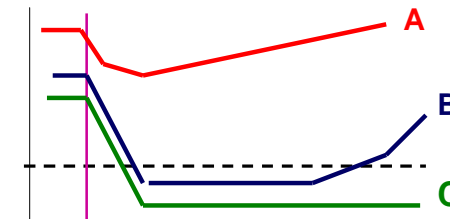
MONITOROVÁNÍ TERAPIE

3 typy průběhu:

A-mírný pokles bez normalizace → NEÚSPĚCH

B-normalizace, ale opětý vzestup → RECIDIVA

C-trvalá normalizace → ÚSPĚŠNÁ TERAPIE



VOLBA STRATEGIE

- Jeden marker (*nížší náklady*)
- Paleta markerů (*nížší specifita, vyšší senzitivita*)
- Kombinace různých druhů testů (*větší diskriminace*)
(biochemické x genomové x hormonové receptory)
- Longitudinální sledování (*monitorování terapie, odkrytí návratu, metastáz*)

Časový rozvrh monitorování

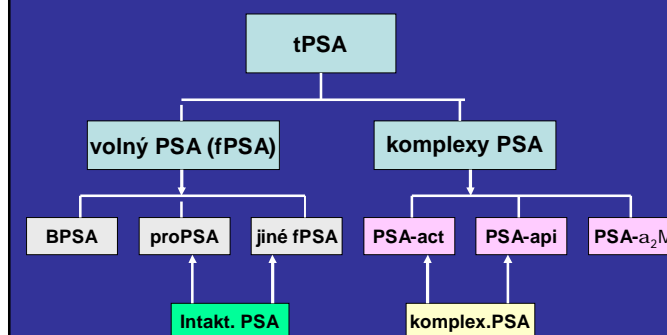
- * před (více markerů zvýšených)
- * po za 14 d
za 1 měs
za 3 měs
každé 3 - 6 měs
- * 2.-4. rok: každých 6 měs
- * 5. rok a další: nejvíce 12 měs

PROSTATA

Karcinom x benign. hyperplazie:

tPSA, fPSA, PSA_{senz.}
fPSA/tPSA
komplexovaný PSA
cPSA/tPSA
Kallikrein (hK2), hK2/fPSA
RT-PCR mRNA_{PSA,PSMA,hK2}
PSMA(prost. spec. membr. Ag)
(Metastázy do kostí) - Kostní markery:
B-ALP, NTx, CTX

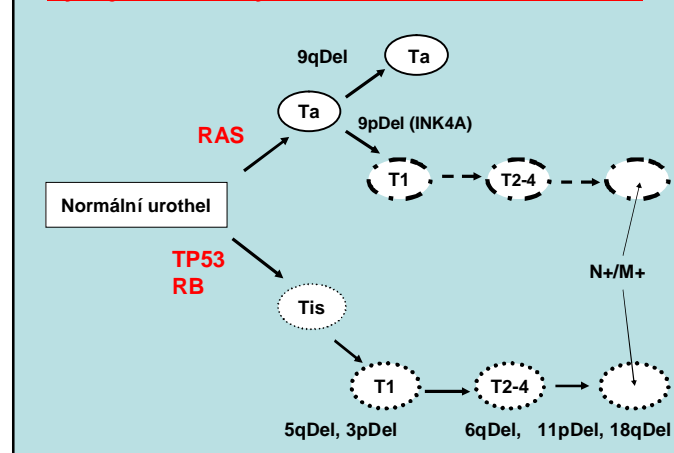
FORMY PSA



MOČOVÝ MĚCHÝŘ (Karcinom)

	<u>Senz.</u>	<u>Spec.</u>
BTA (Basement Membrane Antigen)	40	73
NMP-22 (Nuclear Matrix Protein)	81	77
Telomerasa	80	80
<i>Cystoskopie</i>	40	94

Vývoj molekulových markerů urothelkarcinomu



Kolorektální karcinom

CEA..... 8 %(stadium A),
42%(B), 56%(C), 94%(D)
recidiva lokální: 52%
metastázy do jater: 78%

CA 19-9 jako pomocný marker
CA 242
CA 50

Ve vývoji molekulové markery: K-ras, APC, p53, BAT-26
a „dlouhá“ DNA

Možnosti detekce rizika

- Mutace APC, K-ras, p53 genů... u většiny
- Aneuploidie s delecí raménka chromosomu
1p, 5q, 8p, 18q, 17p u 85 %
- Diploidie (15 %) s mutací BAT-26 u 95 %
- „Dlouhá“ DNA (nepodléhá apoptóze).. až u 90 %

*Kolorektální karcinom je klinicky, fenotypově
a genotypově heterogenní:
Multikomponentní stanovení*

Rozlišení nádorové DNA

Souprava pro detekci tumoru: **BAT-26 v stolici**
(PreGen 26)

↓
pozitivní u > 90% HPNC

KARCINOM PANKREATU

CA 19-9

CEA

CA 242

(GMT)

KARCINOM ŽALUDKU

CA 72-4	52%
CA 19-9	25%
CEA	23%
CYFRA 21-1	22%
CA 242	

KARCINOM LARYNGU a HYPOFARYNGU

SCC 12% (T1), 96%(T2)
CEA (nespec.)
CEA+SCC (u 92% recidiv)

Nový marker – průkaz metaplazie epitelu
ezofagu (žaludku event. kolon)

* **GC-C (guanylyl-cyklasa)**
(detekuje 1 maligní na 10 milionů normálních)

KARCINOM VARLETE

(1) **seminom** hCG(-) AFP(-)
(2) **neseminomové nádory:**
- **Žloutkový váček** hCG (-) AFP (+),
- **Choriokarcinom** hCG (+), AFP (-)
- **Embryonální karcinom** AFP (+, -)
- **Teratokarcinom** hCG (-), AFP (+)
- **Teratomy** negativní jak na hCG tak AFP
Pomocné markery: NSE, SP-1, TPA
laktátdehydrogenasa

HEPATOCELULÁRNÍ KARCINOM

AFP. 80 %-hepat. karcinom , 100% - hepatoblastom
Vazba na LEKTIN
(Dif. dg. hepatom x metastázy x benign. onemocnění)

CYFRA 21-1 10 %
CEA 8 %
(u metastáz jiných nádorů do jater 92%)
CA 19-9 55-70% cholangiokarcinom
ALP (nádorový isoenzym)

KARCINOM PLIC

* **NSE** *malobuněčný*
* **CYFRA 21-1** *nemalobuněčný*
* **SCCA**
* **CEA**
* **TPS**
(kombinace: **CYFRA+NSE**
CYFRA+CEA
NSE+ProGRP (Pro-Gastrin
Releasing Peptide)

KARCINOM PRSU

CA 15-3 *receptory pro estrogeny*
BR 27.29 *pro progesteron*
CEA **Her-2/neu** (c-erbB2) při výběru
TPA, TPS *pacientů pro terapii Herceptinem*
: **Nový, specifický:**
Mamaglobin (kys. glykopeptid, 10,5 kDa; 11q12.2)
z rodiny uteroglobinu; váže se na syntofylin B
mRNA_{mamaglobin}: 10 – 20 krát zvýšený u karcinomu
* detekce mikrometastáz
* screening/časná diagnostika
* určení prognózy (pozitivita v uzlinách)
* sledování účinnosti terapie a průběhu choroby

KARCINOM CERVIX UTERI

* SCCA 55%

* CYFRA 21-1 37%

nebo kombinace: SCCA+CEA
CYFRA 21-1 + CEA

KARCINOM OVARIA

* CYFRA 21-1 nemucinózní
i mucinózní

(rozlišení maligní X benigní: nad 5,8 mg/l

* CA 125 nemucinózní (serózní)
a nediferencovaný
(I. a II. stadium: 54%)

* **CASA** (cancer associated serum antigen): 43.5%

* CEA, CA 72-4 (mucinózní 72%)

* AFP, hCG nádory ze zárodečných buněk

* kallikreiny (hK6, hK10, hK11) *perspektivní u serózních*

KARCINOM ENDOMETRIA

* CEA (*nespecifické*)

* CA 125

* SCCA

* receptory hormonů

CHORIOKARCINOM

* hCG (*sledovat každou
mola hydatinosa nejméně 1 rok*)

* SP-1 (doplňkový)

Nádory thyreoidey

- * **Kalcitonin** (*nádory z C-buněk*)
- * **Thyreoglobulin**
- * **CEA**

MALIGNÍ MELANOM

- * **S-100b** (pro prognózu a monitorování)
senzitivita: až 86%
(pozitivita též při imunoterapii aktivací dendritických buněk)
- * **MIA (melanoma inhibiting activity)**
senzitivita: 80%

FEOCHROMOCYTOM

U-vanilmandlová kys.
(U-homovanilová kys. ..
feochromocytoblastom)

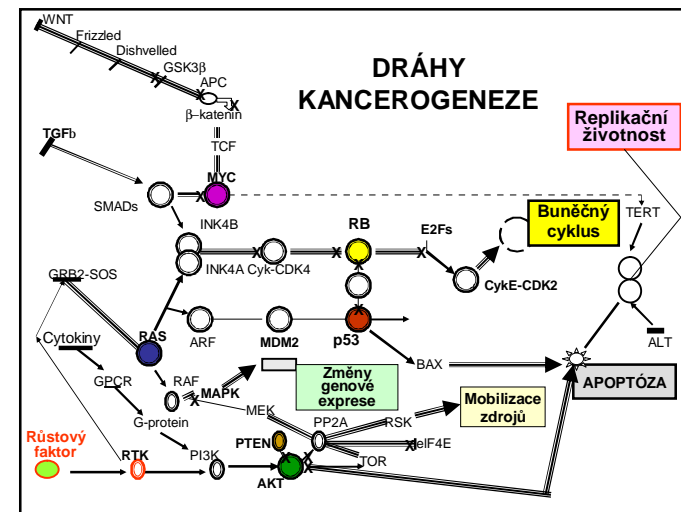
U-metanefriny
U-celkové katecholaminy

P-adrenalin a. noradrenalin (limitované
použití - krátký poločas)

NEUROBLASTOM

- * **U-homovanilová kys. (HVA)**
 - * **U-vanilmandlová kys. (VMA)**
index VMA/HVA (prognóza)
 - * **S-NSE**
 - * **S-ferritin**
- (N-myc)

Nové markery a trendy vývoje



: **Mamaglobin** (kys. glykopeptid, 10,5 kDa; 11q12.2)
z rodiny *uteroglobinu*; váže se na *syntofylin B*

mRNA_{mamaglobin}: 10 – 20 krát zvýšený u karcinomu prsu

- * detekce mikrometastáz
- * screening/časná diagnostika
- * určení prognózy (pozitivita v uzlinách)
- * sledování účinnosti terapie a průběhu choroby

GC-C (guanylyl-cyklasa)

Nový marker – průkaz metaplazie epitelu
ezofagu (žaludku event. kolon)

(detekuje 1 maligní buňku na 10 milionů normálních)

sIL-2Ra

Rozpustný fragment receptoru pro interleukin 2a

Staronový marker: je exprimován hlavně na aktivovaných T-lymfocytech; v minulosti používán u hemoblastóz

V současnosti doporučován jako validní prognostický marker (riziko pozdějších vzdálených metastáz a postižení mizních uzlin) u maligních nádorů z dlaždicových buněk hlavy a krku

Rozlišení nádorové DNA (u CA kolorekta)

Souprava pro detekci tumoru: BAT-26 v stolici
(PreGen 26)

↓
pozitivní u > 90% HPNC

Možnosti detekce rizika kolorektálního CA

- Mutace APC, K-ras, p53 genů....u většiny
- Aneuploidie s delecí raménka chromosomu 1p, 5q, 8p, 18q, 17p u 85 %
- Diploidie (15 %) s mutací BAT-26 u 95 %
- „Dlouhá“ DNA (nepodléhá apoptóze).. až u 90 %

*Kolorektální karcinom je klinicky, fenotypově a genotypově heterogenní:
Multikomponentní stanovení*

Detekce cirkulujících nádorových buněk u minimální neoplastické reziduální choroby

Morfologie krve	10 ⁹
Průtoková cytometrie	10 ⁸
PCR v reálném čase	10 ⁵
RT-PCR, imunocytochemie	10 ³
MR-RT-PCR	10 ²
(4-barevná imunofluorescence) ↑	
<u>Metodika</u>	Počet nádorových buněk v oběhu

BCR/ABL
(chron. myel. leukemie)
PCR mRNA
(ca-prostaty)
Tyrosinasa
= **TYR-test**
(u melanomu)

Jen nádorové buňky jsou v cirkulaci !

**Proteinové markery budou určovat
individuální
léčení nádorových onemocnění**

98 % chorob má genetický podklad;
1 gen může kódovat více než 100 různých
proteinů
*Tyto proteiny se však mohou změnit den ze
dne*

Současný výzkum zaměřen na hledání klíčových
molekul uplatňujících se v dráhách kancerogeneze:

- Buněčný cyklus
- Poškození DNA
- Antiapoptóza
- Angiogeneza
- Proliferační signály
- WNT-katenin
- Udržení telomerů
- Protinádorová obrana

Jednotlivé členy
signálních drah
alterovaných
v nádorové buňce

*Tyto molekuly jsou nejenom nádorové markery podle
uvedené definice, ale jsou cílovými molekulami
specifické protinádorové terapie*

REZISTENCE vůči CHEMOTERAPII

Genová amplifikace dihydrofolátreduktasy (DHFR):

*Je navozena jejím inhibítorem – methotrexátem
(přežívající nádorové buňky amplifikují gen DHFR
až 1000násobné kopie – nikoliv buňky normální)*

Amplifikace genu multidrug-transport protein
neboli P170

*Je to transmembránový fosfoprotein (ATP-pumpa):
vytlačuje hydrofobní toxické látky z buňky ven
(Je normálně v hepatocytech, enterocytech,
renálních tubulech – součást ABC-transporterů
ATP-binding cassette transporter)*

**Membránové receptory
rodiny HER**

HER 1 (=EGFR)

HER 2 (=ErbB2=HER2/neu)

HER 3 (ErbB3)

HER 4 (ErbB4)

Blokování se děje:

- vazbou se speci-
fickou Mab
- inaktivací malou
molekulou

*Receptory mají 3 domény (extra-, trans- a intracelulární, kterou
je tyrosinkinasa, vyjma HER3); vazba ligandu navodí dimerizaci;
heterodimery (HER1/HER2) jsou stabilní, proto nadměrná exprese
HER2 udržuje EGFR-signalizaci (včetně proliferace)*

HER 2

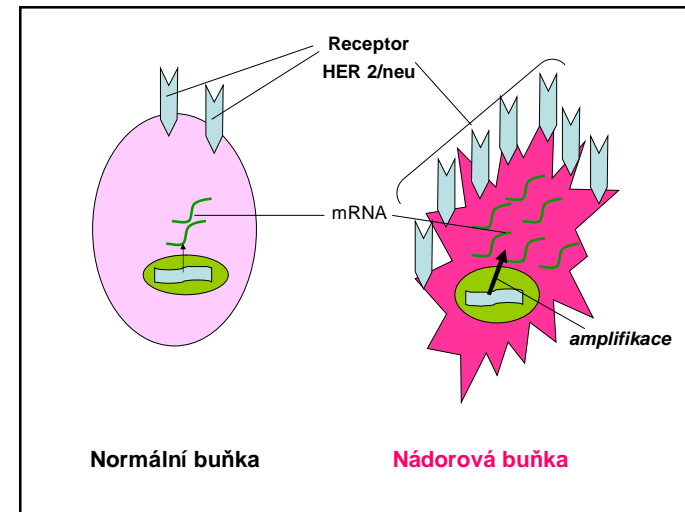
Gen výrazně amplifikován (2 – 20krát) u 30% karcinomu mléčné žlázy (nezávislý prediktor horší prognózy- kratší přežívání, časté relapsy)

Též u jiných tumorů (nemalobuněčný ca-plic, ca- ovaria nebo žaludku)

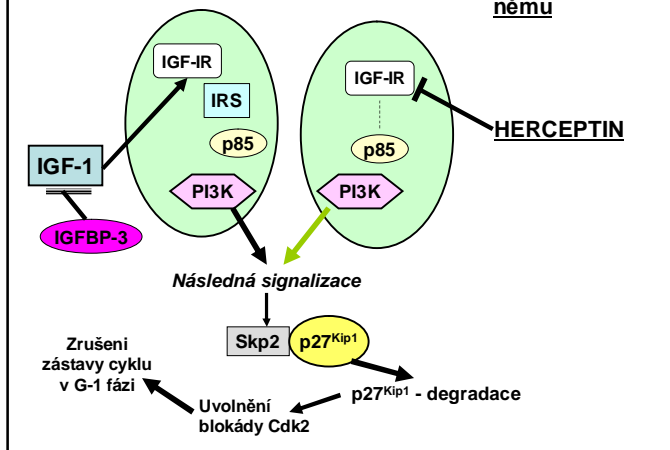
Blokován:

Trastuzumab (Herceptin) – váže se na extracel. doménu HER2

2C4 – váže jiný epitop HER2 (inhibuje heterodimerizaci HER2 s jinými HER; účinný i při malé expresi HER2)



Mechanismus účinku trastuzumabu a rezistence vůči němu



Technika vyhledávání nových biomarkerů onkogeneze

MALDI-TOF-MS = Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry proteinů v nádorové tkáni při porovnání s tkání nenádorovou
Takto je *definován profil proteinů* sdružených s určitým tumorem (tj. de novo syntéza, upregulace, downregulace ..)

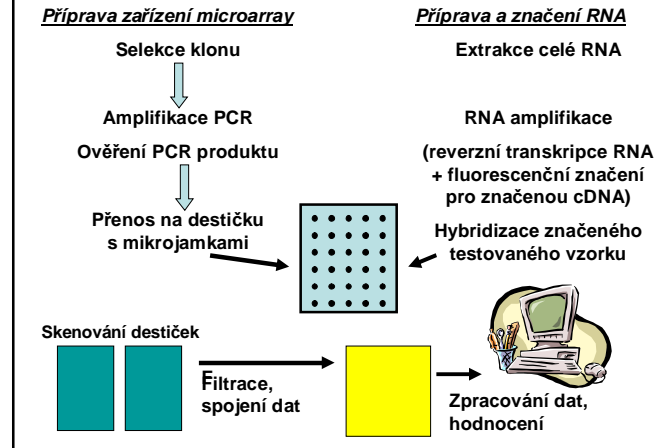
Z tohoto jsou vybrány kandidátní proteiny pro diagnostiku a terapii

Následují fáze ověřování a testování (fáze I, II, III, IV)

Nově zaváděné techniky detekce

- **Microelectronic array technology pro SNP**
Příklad: vyšetření mutací RET protoonkogenu (kóduje transmembránový receptor tyrosinkinasy, který má klíčovou úlohu při vzniku **neuroblastomu**, **feochromocytomu** nebo **medulárního karcinomu thyreoidey**)
- * **SELDI-TOF Protein Chip Systém** (surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass-spectrometry)
Příklad: vyšetření proteinového profilu séra pacientů s **karcinomem hlavy a krku** (odhalen nový nádorový marker – **metallopanstimulin-1 (MPS-1)**)

MICROARRAY technologie



... děkuji za pozornost a trpělivost