

## 9. Seznam příloh

### Publikace autorky:

- A. Plzeňský lékařský sborník 2015, HE4 In Comparison with other biomarkers in ovarian cancer diagnostic
- B. Anticancer research 2009 (IF1,4) Test of Ovarian Cancer Multiplex xMAP Technology Panel
- C. Anticancer research 2015 (IF1,8) PHI in the Early Detection of Prostate Cancer
- D. Biologická aktivita nádoru. Aneb proč stanovovat biomarkery v onkologii. 2014
- E. Využití biomarkerů pro diagnostiku a monitoraci léčby karcinomu vaječnicků. 2014
- F. Biomarkery v onkologii. 2014
- G. Princip a využití imunoanalytických metod. 2014

## A.

Plzeň. lék. Sborn. 80, 2014: 21–26

### HE4 IN COMPARISON WITH OTHER BIOMARKERS IN OVARIAN CANCER DIAGNOSTICS

M. Casova<sup>1</sup>, R. Kučera<sup>1</sup>, S. Svobodová<sup>1</sup>, J. Presl<sup>2</sup>, O. Topolčan<sup>1</sup>,  
Z. Novotný<sup>2</sup>, J. Windrichová<sup>1</sup>, R. Fuchsová<sup>1</sup>, L. Betincová<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Immunoanalysis

<sup>2</sup>Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty Hospital in Pilsen, Czech Republic

Ovarian cancer is the leading cause of gynecological cancer death, representing 5% of all cancers in women and 23% of gynecological cancer. Ovarian cancer has a poor prognosis, mainly because of the late detection. Mortality, despite the decline in the last 10 years, is still very high. Worldwide attention is therefore focused on the potential research and the subsequent treatment of this cancer (1, 2).

The first aim of our study was to evaluate if human epididymis protein 4 (HE4) is a useful biomarker and broadens the possibilities in ovarian cancer diagnostics. The second aim was to evaluate the benefits of each biomarker of our panel for the ovarian cancer diagnostics. We compared the results of following tumor markers: cancer antigen 125 (CA 125), HE4, cancer antigen 19-9 (CA 19-9), cancer embryonic antigen (CEA), thymidinkinase (TK), tissue polypeptidic antigen (TPS) and tissue polypeptidic antigen (MonoTotal).

#### MATERIAL AND METHODS

The total number of females in our study was 266. We divided the patients into two groups. The age characteristic of both groups is shown in the Tab. 1. The first group consisted of 19 females with ovarian cancer with equal representation of stages FIGO I–IV. Second group included 247 patients with benign diseases (ovarian cysts, myomas, endometrial polyps). Serum samples were collected prior to surgery or any other form of treatment. All cancer diagnoses were histologically verified.

The serum samples were analyzed at the Laboratory of Immunoanalysis, Faculty of Medicine in Pilsen, (Czech Republic) from March 2010 to January 2012. Samples of venous blood were collected using the VACUETTE blood collection system (Greiner Bio-one Company, Kremsmünster, Austria). Blood was centrifuged for 10 minutes at 1700 ×g. Serum samples were immediately frozen to –80 °C. Samples were thawed only once, just prior to analyses. Serum levels of CA 125, CEA and CA 19-9 were measured using a DxI instrument (Beckman Coulter, Brea, California, USA). Serum levels of HE4 were measured using an enzyme immunometric assay kit (Fujirebio Diagnostics, Göteborg, Sweden). TK was measured using radioisotope assay kit (Immunotech, Prague, Czech Republic). TPS and MonoTotal were measured using IRMA radioisotope assay kits (IDL Biotech, Bromma, Sweden).

**Tab. 1** Age characteristic of the patient groups

| Diagnosis            | Count (N) | Age (years) |        |      |      |
|----------------------|-----------|-------------|--------|------|------|
|                      |           | Mean        | Median | Min. | Max. |
| Ovarian cancer       | 19        | 65.63       | 62     | 43   | 84   |
| Benign ovarian tumor | 247       | 61.24       | 54     | 33   | 79   |

**Tab. 2** Ovarian cancer vs: benign tumor

| Parameter (units) | Diagnosis | N   | Mean    | Median  | Range        | <i>p</i> -Value Wilcoxon test |
|-------------------|-----------|-----|---------|---------|--------------|-------------------------------|
| CA 125 (kIU/l)    | Cancer    | 19  | 1669.00 | 1725.00 | 54.00 – 4621 | <0.0001                       |
|                   | Benign    | 247 | 27.50   | 14.00   | 23.00 – 1244 |                               |
| HE4 (pmol/l)      | Cancer    | 19  | 595.06  | 421.9   | 50.87 – 3266 | <0.0001                       |
|                   | Benign    | 247 | 80.24   | 52.70   | 23.00 – 1570 |                               |
| MonoTotal (IU/l)  | Cancer    | 19  | 626.9   | 501.7   | 710.9 – 2844 | <0.0001                       |
|                   | Benign    | 247 | 79.50   | 49.90   | 5.00 – 2255  |                               |
| TPS (IU/l)        | Cancer    | 19  | 309.1   | 144.0   | 25.00 – 1453 | <0.0001                       |
|                   | Benign    | 247 | 83.27   | 46.00   | 10.00 – 1226 |                               |
| TK (IU/l)         | Cancer    | 19  | 11.11   | 9.50    | 3.50 – 24.10 | 0.3022                        |
|                   | Benign    | 247 | 9.56    | 5.90    | 2.50 – 29.80 |                               |
| CA 19-9 (kIU/l)   | Cancer    | 19  | 23.00   | 11.00   | 1.00 – 124.0 | 0.3060                        |
|                   | Benign    | 247 | 16.27   | 8.00    | 1.00 – 428.0 |                               |
| CEA (µg/l)        | Cancer    | 19  | 25.00   | 5.30    | 2.50 – 225.0 | 0.1471                        |
|                   | Benign    | 247 | 1.83    | 1.20    | 0.50 – 20.60 |                               |

CA 125 (cancer antigen 125), HE4 (human epididymis protein 4), MonoTotal (tissue polypeptidic antigen), TPA (tissue polypeptidic antigen), TK (thymidinkinase), CA 19-9 (cancer antigen 19-9), CEA (cancer embryonic antigen)

The SAS 9.2 (Statistical Analysis Software release 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used for all statistical analysis. A summary of statistical findings for age and serum levels of each of the analytes was presented. The Wilcoxon test was used to compare distributions of values between benign and malignant tumors.

## RESULTS

Comparing the parameters of serum level markers between the benign and malignant groups of patients a statistically significant differences were found in the following bio-markers: CA 125, HE4, MonoTotal and TPS ( $p < 0.0001$  for each analyte). CA 19-9, TK and CEA were not significant. All the results are shown in Tab. 2.

Tab. 3 shows the analytical parameters of all biomarkers which were used in the study. We have evaluated cut-off, sensitivity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) at 95% specificity. We have calculated area under the curve (AUC) and the biomarkers in Tab. 2. and Tab. 3. are ranked according this parameter. The highest level of AUC was achieved for CA 125 (AUC = 0.987), the second highest level was achieved for HE4 (AUC = 0.907) and the lowest level was achieved for CEA (AUC = 0.483).

## DISCUSSION

Tumor markers are currently used for the follow-up and therapy effect monitoring. In evaluating data, we have focused on the possibilities of using selected biomarkers in ovarian cancer diagnostics. Our panel of biomarkers consisted of the traditional tumor markers (CA125, CA19-9, CEA) which have been used in relations to the ovarian cancer for a long time. Then we evaluated a relatively new marker HE4, which we started to measure in 2010. In addition we have filled in the biomarker panel with the proliferative tumor markers from the group of cytokeratins (TPS, MonoTotal) and non-specific tumor marker TK.

CA 125 determination in combination with ultrasonography was used in the past for the diagnosis of ovarian cancer (3, 4). A major disadvantage of CA 125 is that up to 20% of ovarian cancers lack expression of this antigen. The second disadvantage is a low specificity of CA 125. Abnormal serum levels of CA 125 may be observed in several benign and malignant diseases (5, 6). It is therefore necessary to combine CA 125 with the other tumor markers to provide a better diagnostic efficiency.

The combination of CA125 and HE4 improves the results achieved by CA125 alone. About 20% of epithelial ovarian cancer show a slight elevation of CA125. For more than 50% of these malignancies, elevated levels of HE4 can be observed, and combinations of these markers may therefore optimize the potential for a successful diagnosis of ovarian malignancy in these patients. Another factor supporting a combination of both markers is that elevated levels of CA125 can be observed as a result of physiological conditions such as menstruation or pregnancy, as well as in benign ovarian tumor, inflammation and the presence of endometriosis and fibroids. This false positivity in the group of premenopausal patients may cause problems in routine clinical practice. Therefore, a combination of HE4 and CA125 increases specificity and sensitivity of testing in ovarian cancer diagnostics.

Using of biomarker HE4 as a single test in ovarian cancer testing is also problematic. Mucinous ovarian cancer has almost no expression of HE4. HE4 serum levels are very low or negative. HE4 is overexpressed in serous and endometrioid histotype of the ovarian cancer. Preliminary studies of HE4 reported a higher specificity than CA 125 in different benign and malignant conditions, excluding renal failure (7). Patients with renal failure had very high HE4 serum levels. Patients with this disease were excluded from our study. The major part of the studies in serum has been already published that HE4 sensitivity and specificity were better than CA 125 (8–12). Our results didn't confirm this fact. If we consider our results, we see that the best values were achieved for CA125 followed by HE4.

Tab. 3 Analytical parameters of individual analytes at specificity 95%

| Analyte (units) | CA 125 (kIU/l) | HE4 (pmol/l) | MonoTotal (IU/l) | TPS (IU/l)   | TK (IU/l)    | CA 19-9 (kIU/l) | CEA (µg/l)   |
|-----------------|----------------|--------------|------------------|--------------|--------------|-----------------|--------------|
| AUC             | <b>0.987</b>   | <b>0.907</b> | <b>0.836</b>     | <b>0.755</b> | <b>0.676</b> | <b>0.573</b>    | <b>0.483</b> |
| Cut-off         | 70.000         | 124.100      | 231.100          | 248.700      | 17.000       | 43.000          | 4.600        |
| Sensitivity     | 89.500         | 73.330       | 63.280           | 36.810       | 22.280       | 16.710          | 11.100       |
| PPV             | 50.000         | 50.180       | 63.160           | 29.210       | 18.280       | 15.840          | 11.170       |
| NPV             | 99.000         | 97.510       | 97.900           | 96.520       | 96.000       | 95.400          | 95.000       |

AUC: area under the curve; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value

Our data are consistent with the second group of the studies with the higher sensitivity of CA 125 than HE4 (13, 14).

Cytokeratins were included in our panel because significantly elevated serum levels of TPS were found in serum samples from patients who had ovarian carcinoma compared with patients who had benign tumors (6, 15).

Tumor markers CA 19-9, TK and CEA didn't show statistically significant different serum levels in the group of malignant tumors, compared to other benign ovarian diagnoses. These two markers are often elevated in relation to the benign or malignant disease of the gastrointestinal tract and therefore they are not directly related to gynecological diagnosis. CA 19-9 can be useful as an additional parameter in diagnostics of the mucinous type of ovarian cancer. In this case is the CA 19-9 elevated (16). However, their ability to distinguish between benign and malignant tumor is limited. Elevated serum levels may be found in benign mucinous tumors as well as in malignant tumors (17). In conclusion, determination of HE4 levels, together with CA125 improves a primary detection of ovarian cancer and broadens the range of differential diagnostic possibilities for distinguishing between malignant and benign tumors. MonoTotal and TPS confirmed their status of markers of proliferation and can be used to the monitoring the activity and aggressiveness of the tumor. Tumor markers CA 19-9, TK and CEA didn't show statistically significant different results.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by Ministry of Health, Czech Republic – conceptual development of research organization (Faculty Hospital in Pilsen – FNPI, 00669806).

#### SUMMARY

Ovarian cancer is the leading cause of gynecological cancer death. The first aim of our study was to evaluate if HE4 broadens the possibilities in ovarian cancer diagnostics. The second aim was to evaluate the benefits of each biomarker of our panel. We compared the results of following tumor markers: CA 125, HE4, CA 19-9, CEA, TK, TPS, MonoTotal.

The total number of females in our study was 266. We divided the patients into two groups. The first consisted of 19 females with ovarian cancer and the second of 247 females with benign ovarian tumors. Serum samples were collected prior to surgery or any other form of treatment.

Significant difference between the benign and malignant group was found in following biomarkers: CA 125, HE4, MonoTotal and TPS. CA 19-9, TK and CEA were not significant. We have evaluated cut-off, sensitivity, positive predictive value and negative predictive value at 95% specificity and area under the curve (AUC). The highest level of AUC was achieved for CA 125 (AUC = 0.9951), the second highest level (AUC = 0.9534) was achieved for HE4 and the lowest level (AUC = 0.5324) was achieved for CEA marker. In conclusion determination of HE4 levels, together with CA125 improves a primary detection of ovarian cancer. MonoTotal and TPS confirmed their status of marker of proliferation and they can be used for the monitoring the activity and aggressiveness of the tumor. Tumor markers CA 19-9, TK and CEA didn't show statistically significant different results.

### *HE4 v porovnání s ostatními biomarkery v diagnóze rakoviny vaječníku*

#### SOUHRN

Rakovina vaječníku je nejčastější příčinou úmrtí v oblasti zhoubných gynekologických onemocnění. Cílem naší studie bylo v první řadě zhodnotit, zda vyšetření HE4 je schopno rozšířit možnosti v diagnostice karcinomu vaječníku. Naším dalším cílem bylo zhodnotit přínos jednotlivých biomarkerů námi vybraného panelu. V naší práci jsme porovnali výsledky těchto nádorových markerů: CA 125, HE4, CA 19-9, CEA, TK, TPS a MonoTotal. Celkový počet žen v naší studii byl 266. Soubor jsme rozdělili do dvou skupin. První skupina se skládala z 19 žen s rakovinou vaječníku a druhá z 247 žen s benigními ovariálními tumory. Vzorky séra byly odebrány před operací nebo zahájením jiné formy léčby. Statisticky významný rozdíl mezi benigní a maligní skupinou byl nalezen v hodnotách následujících biomarkerů: CA 125, HE4, MonoTotal a TPS. Rozdíly v hodnotách CA 19-9, CEA a TK nebyly statisticky významné. Zhodnotili jsme cut-off, citlivost, pozitivní prediktivní hodnotu (PPV) a negativní prediktivní hodnotu (NPV) při 95 % specifitě a plochu pod křivkou (AUC). Nejvyšší úroveň AUC bylo dosaženo u CA 125 (AUC = 0,9951), druhé nejvyšší úroveň (AUC = 0,9534) bylo dosaženo u HE4 a nejnižší hladina (AUC = 0,5324) byla naměřena u CEA. Závěrem je možná říci, že stanovení HE4, spolu s CA125 zlepšuje primární detekci rakoviny vaječníku. Nádorové markery MonoTotal a TPS potvrdily svůj status markerů proliferace a mohou být použity pro sledování růstu a agresivitu nádoru. Nádorové markery CA 19-9, TK a CEA nevykazovaly statisticky významně odlišné výsledky.

## REFERENCES

1. Oberaigner W., Minicozzi P., Bielska-Lasota M. et al.: Survival for Ovarian Cancer in Europe: The across-country variation did not shrink in the past decade. *Acta Oncol.* 51, 2012: 441–3. – 2. Jemal A., Siegel R., Ward E. et al.: Cancerstatistics. *CA Cancer J. Clin.* 57, 2007: 43–66. – 3. Bast Jr R. C., Badgwell D., Lu Z. et al.: New tumour markers: CA 125 and beyond. *Int. J. Gynecol. Cancer* 15, 2005: 274–81. – 4. Rosenthal A. N., Menon U., Jacobs I. J.: Screening for ovarian cancer. *Clin. Obstet. Gynecol.* 49, 2006: 433–47. – 5. Li J., Dowdy S., Tipton T. et al.: HE4 as a biomarker for ovarian and endometrial cancer management. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 9, 2009: 555–66. – 6. Fritsche H. A., Bast R. C.: CA 125 in Ovarian Cancer: Advances and Controversy. *Clin. Chem.* 44, 1988: 1379–80. – 7. Escudero J. M., Auge J. M., Filella X. et al.: Comparison of serum human epididymis protein 4 with cancer antigen 125 as a tumor marker in patients with malignant and nonmalignant diseases. *Clin. Chem.* 57, 2011: 1534–44. – 8. Moore R. G., McMeekin D. S., Brown A. K. et al.: A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol. Oncol.* 112, 2009: 40–6. – 9. Van Gorp T., Cadron I., Despierre E. et al.: HE4 and CA125 as a diagnostic test in ovarian cancer: prospective validation of the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm. *Br. J. Cancer* 104, 2011: 863–70. – 10. Anastasi E., Marchei G. G., Viggiani V. et al.: HE4: a new potential early biomarker for the recurrence of ovarian cancer. *Tumour Biol.* 31, 2010: 113–119. – 11. Sandri M. T., Bottari F., Franchi D. et al.: Comparison of HE4, CA125 and ROMA algorithm in women with a pelvic mass: Correlation with pathological outcome. *Gynecol. Oncol.* 128, 2013: 233–8. – 12. Azzam A. Z., Hashad D. I., Kamel N. A.: Evaluation of HE4 as an extrabiomarker to CA125 to improve detection of ovarian carcinoma: is it time for a step forward? *Arch. Gynecol. Obstet.* 287, 2013: 404–13. – 13. Partheen K., Kristjansdottir B., Sundfeldt K.: Evaluation of ovarian cancer biomarkers HE4 and CA-125 in women presenting with a suspicious cystic ovarian mass. *J. Gynecol. Oncol.* 22, 2011: 244–52. – 14. Chang X., Ye X., Dong L. et al.: Human epididymis protein 4 (HE4) as a serum tumor biomarker in patients with ovarian carcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer* 21, 2011: 852–8. – 15. Sedlaczek P., Frydecka I., Gabryś M. et al.: Comparative analysis of CA125, tissue polypeptide specific antigen, and soluble interleukin-2 receptor alpha levels in sera, cyst, and ascitic fluids from patients with ovarian carcinoma. *Cancer* 95, 2002: 1886–93. – 16. Engelen M. J., de Bruijn H. W., Hollema H. et al.: Serum CA 125, carcinoembryonic antigen, and CA 19-9 as tumor markers in borderline ovarian tumors. *Gynecol. Oncol.* 78, 2000: 16–20. – 17. Kelly P. J., Archbold P., Price J. H. et al.: Serum CA19.9 levels are commonly elevated in primary ovarian mucinous tumours but cannot be used to predict the histological subtype. *J. Clin. Pathol.* 63, 2010: 169–73.

Author's address: R. K., E. Beneše 13, 305 99 Pilsen Czech Republic

## Test of Ovarian Cancer Multiplex xMAP Technology Panel

JINDRA VRZALOVA<sup>1,3</sup>, MARKETA PRAZAKOVA<sup>1,3</sup>, ZDENEK NOVOTNY<sup>2</sup>,  
ONDREJ TOPOLCAN<sup>1,3</sup>, MIROSLAVA CASOVA<sup>1</sup> and LUBOS HOLUBEC JR.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Immunoanalysis, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University in Prague;  
<sup>2</sup>Departments of Gynaecology and Obstetrics, <sup>3</sup>Nuclear Medicine, and  
<sup>4</sup>Oncology, Faculty Hospital in Pilsen, Czech Republic

**Abstract.** *Background: An ovarian cancer marker panel including leptin, prolactin, osteopontin, insulin-like growth factor II (IGFII), macrophage migration inhibitory factor and CA125 was tested for multiplex marker measurement. Multiplex was compared to single assayed tumour markers: CA125, TPS, thymidine kinase, monototal and HE4. Patients and Methods: The serum marker levels in ovarian cancer patients were compared to controls with benign ovarian disease. xMAP technology was used for multiplex panel and routine immunoanalytic methods for other markers. Results: Considering the multiplexed markers, only CA125, osteopontin and IGF-II differed significantly between groups. Levels of all non-multiplexed tumour markers were significantly higher in the cancer group compare to the control. Conclusion: Multiplex is a powerful tool for multiparametric studies, but we are still in the era of looking for the right marker combinations for cancer diagnostics and monitoring. The panel will be tested on a larger ovarian cancer cohort and in patients with other cancer and non-cancerous diseases.*

Ovarian cancer has been termed the 'silent killer' with an incidence of 10.94 and a mortality of 7.28 per 100,000 inhabitants in the Czech Republic in 2005 (according to the Institute of Health Information and Statistics of the Czech Republic). Unfortunately, medical science is still ill equipped to diagnose this disease in its initial stages, which results in a high mortality. As yet, there is no marker established for screening or early diagnostics; for treatment monitoring and follow-up CA125 is in use. But the latest developments in ovarian cancer therapy, namely the introduction of novel anticancer drugs based on anti-CA125 antibodies will exclude the possibility of therapy, monitoring by CA125 serum levels

*Correspondence to:* Jindra Vrzalova, Laboratory of Immunoanalysis, Department of Nuclear Medicine, Faculty Hospital in Pilsen, Dr. E. Benese 13, Plzen 30599, Czech Republic. Tel: +42 0377402573, Fax: +42 0377402454, e-mail: vrzalovaj@fnplzen.cz

*Key Words:* Ovarian cancer, multiplex, tumour markers, panel.

alone because according to our experience these drugs interfere in the CA125 immunoassays. The use of CA125 is also affected by a very frequent non-specific elevation of the marker in a number of physiological and pathological processes. CA125 has been shown to be elevated in women with cirrhosis, congestive heart failure and in the presence of ascites, and has been reported to vary by age, race/ethnicity, smoking history, obesity, other gynecological factors (endometriosis, hysterectomy, hormone therapy use) and other malignancies besides ovarian cancer (1).

For these reasons, the development of novel biomarkers is necessary. More than ten years ago, a combination of markers was shown to be more effective than a single marker for pelvic mass management (2). The introduction of novel multiplexed immunoanalytic assays has enabled a new era of multiparametric panel studies. One such analytical tool is bead-based multi-analyte profiling technology (xMAP) (3). The xMAP technology is being used in oncological research projects focused on biomarker development (4-7).

In this study, a commercially available xMAP multiplex panel was tested for the measurement of serum levels of markers of tumour biological activity, specifically designed for ovarian cancer including leptin, prolactin (PRL), osteopontin (OPN), insulin-like growth factor II (IGF-II), macrophage migration inhibitory factor (MIF) and CA125. It was tested in a group of ovarian cancer patients and patients with benign ovarian disease as a control, and results were compared to levels of non-multiplexed serum tumour markers: CA125, TPS, thymidine kinase (TK), monototal and novel tumour marker HE4.

### Patients and Methods

*Patient groups.* The multiplex panel was studied in a group of 19 women with ovarian cancer of FIGO stages 3 or 4. As a benign control group 20 patients with benign ovarian cysts were enrolled. The age of the patients ranged from 16 to 94 years. The median age in the control group was 42.5 years (range 16-68) and in the cancer group was 57 years (range 44-94).

Peripheral blood was drawn using VACUETTE® Z Serum Sep tubes (Greiner Bio-One, Austria) and allowed to clot. Sera were separated by centrifugation at 1700 ×g for 10 min and all specimens were immediately aliquoted and frozen. Samples were stored at -80°C.



No more than 1 freeze-thaw cycle was allowed before an analysis. Before a multiplex analysis, the aliquots were centrifuged for 5 min. at 10,000  $\times$ g to remove any clots or particles.

**Biomarker measurement.** Serum levels of MIF, PRL, CA125, leptin, OPN and IGF-II were measured by xMAP technology using the commercially available kit Beadlyte<sup>®</sup> Human Cancer Biomarker Panel (Millipore-Upstate, USA) and Luminex 100 instrument (Luminex Corp., USA). For the assay, 50  $\mu$ l of serum diluted 1:6 for 5-plex and 1:20 acid/ethanol treated serum for IGF-II monoplex were used. The multiplex analysis was run in duplicate.

Serum levels of single tumour markers were measured by routinely used immunoassays: TK (radioenzymic immunoassay, Immunochem-Beckman Coulter, CR, USA), TPS (IRMA; IDL BIOTECH AB), monototal (IRMA; IDL BIOTECH AB, Sweden) and HE4 (ELISA; Fujirebio, Japan). CA125 levels were measured for comparison by the routinely used chemiluminescence automated immunoassay on a Dxl 800 instrument (Beckman Coulter, USA). Results of CA125 obtained by the multiplex method are stated in the article as CA125<sub>Luminex</sub>.

**Statistical methods.** A descriptive statistic was calculated for all markers. Wilcoxon test was used for a comparison of marker levels between groups. The significance was set for *p*-values lower than 0.05. For all markers receiver operating characteristics (ROC) analysis was performed; the area under ROC curves (AUC), sensitivity for 95% specificity and a related cut-off were calculated. Correlations of patient age to marker levels were calculated without respect to the cancer or the benign diagnoses. Because the multiplex is not a routine method, mean coefficients of variation (CV%, relative standard deviation as percentage) were calculated for all multiplexed analytes. Results under the calibration curve ranges were stated as the value of the lowest calibration point. For a comparison of CA125 analytical methods, rank order correlation was performed (Spearman correlation coefficient was calculated).

## Results

Results for all markers are shown in Table I. Considering the biological activity markers included in the multiplex panel, only CA125<sub>Luminex</sub>, OPN and IGF-II differed significantly between groups. OPN levels were higher in the cancer group. On the contrary, IGF-II levels were significantly lower in the cancer group. Serum levels of MIF, PRL and leptin did not significantly differ between groups. Levels of all non-multiplexed tumour markers were significantly higher in the cancer group compared to those in the benign control. A significant difference in age between groups was observed (*p*=0.0007), the benign group being younger with a median age of 42.5 years contrary to the cancer group with a median age of 57 years, but no correlation between age and serum levels was found for any of the markers.

All studied markers can be ordered by decreasing AUC as follows: HE4, CA125, monototal, TPS, CA125<sub>Luminex</sub>, IGF II, TK, OPN, MIF, leptin and PRL. The mean coefficient of variation for doublets in multiplex analysis was best for MIF and worst for OPN. CV% for MIF (2.74%), PRL (3.59%) and leptin (2.49%) were below 5%, while that for IGF-II (7.99%) was below 10%. CV% for CA125<sub>Luminex</sub> (11.24%)

and OPN (14.44%) were slightly higher but still below 15%.

For two markers from multiplex panels, some non-measurable values were obtained *i.e.* for some samples levels less than the calibration curve occurred. In CA125<sub>Luminex</sub> analysis, 9 results (7 from the benign group, 2 from the cancer group) were lower than the lowest standard. In OPN analysis, 16 results (12 from the benign group, 4 from the cancer group) were below the calibration values.

CA125 levels analysed by multiplex measurement correlated with routine immunoassay, with a correlation coefficient of 0.72087 (*p*<0.0001), but discrepant values were observed. CA125 measured by the routine method gave more than 20-fold higher values than CA125 values obtained by multiplex measurement.

## Discussion

The commercially available multiplex panel used was developed following proteomic studies by Mor *et al.* They initially used microarray analysis to determine 169 proteins in serum from healthy women and women with newly diagnosed and recurrent ovarian cancer. Proteins showing significant differences between controls and cancer patients were further validated by an ELISA method (8). On the basis of this study, they introduced the multiplex panel and it was tested with four different multiparametric result interpretation systems for ovarian cancer detection. The best multiparametric result in conjunction with the use of a multiplex panel of blood biomarkers in their study had 95.3% sensitivity and 99.4% specificity for the detection of ovarian cancer (7). For multiparametric statistical testing of 6-plex panel, a patient cohort of at least 500 probands is necessary which is why it was not possible to test the multiparametric data handling in our study.

Contrary to the results of Mor *et al.*, in this study 3 out of the 6 multiplex markers did not reach any significant difference between the cancer and benign groups. This could have been caused by a very narrow selection of benign disease in the control group, *i.e.* only patients with benign ovarian cysts were enrolled. Leptin and PRL have been discussed as tumour markers for several years, however no difference in their levels between groups was observed. Leptin plays a role in adipose tissue metabolic pathways and alterations of serum leptin levels in obesity and in obesity-related syndromes are known. Unfortunately, no data on body mass indices or weights of patients enrolled into the study were available and so it was not possible to exclude differences of these factors between the studied groups, which could have influenced the results. Thorpe *et al.* have shown that PRL levels are affected by collection methods and proposed that PRL elevations in comparison to a healthy group, traditionally being explained by cancer disease, can be a consequence of surgical treatment of cancer patients. On the contrary, levels of MIF and CA125 have been reported to be unaffected (9).

Table 1. *Statistical results.*

| Patient group                 | Characteristic   |               |                                   |               |                 |                    |                 |                |               |                  |                  |
|-------------------------------|------------------|---------------|-----------------------------------|---------------|-----------------|--------------------|-----------------|----------------|---------------|------------------|------------------|
|                               | Multiplex        |               |                                   |               |                 |                    | Standard method |                |               |                  |                  |
|                               | MIF<br>pg/ml     | PRL<br>ng/ml  | CA125 <sub>LUMINEX</sub><br>IU/ml | OPN<br>ng/ml  | Leptin<br>ng/ml | IGF-II<br>ng/ml    | HE4<br>pM       | CA125<br>IU/ml | TK<br>IU/l    | TPS<br>IU/l      | Monototal<br>U/l |
| Benign                        |                  |               |                                   |               |                 |                    |                 |                |               |                  |                  |
| Median                        | 372.61           | 8.10          | 0.25                              | 0.15          | 11.06           | 2649.38            | 49.25           | 10.95          | 5.90          | 30.00            | 53.30            |
| 5-95%                         | 58.80<br>2360.01 | 2.56<br>47.52 | 0.19<br>5.39                      | 0.15<br>3.26  | 3.50<br>29.35   | 1869.51<br>4425.97 | 35.65<br>62.55  | 4.60<br>19.35  | 2.50<br>14.90 | 10.00<br>276.00  | 0<br>246.25      |
| Cancer                        |                  |               |                                   |               |                 |                    |                 |                |               |                  |                  |
| Median                        | 596.32           | 11.54         | 4.00                              | 2.35          | 7.48            | 978.99             | 329.94          | 212.00         | 18.00         | 148.00           | 198.95           |
| 5-95%                         | 63.97<br>2909.62 | 0.33<br>56.65 | 0.19<br>83.24                     | 0.15<br>11.97 | 1.27<br>110.34  | 118.45<br>5033.51  | 41.70<br>6060.0 | 7.30<br>1744.0 | 5.10<br>42.00 | 41.00<br>2400.00 | 93.20<br>4011.10 |
| <i>p</i> -Value Wilcoxon test | 0.0973           | 0.6657        | 0.0011                            | 0.0027        | 0.4611          | 0.0033             | <0.0001         | 0.0002         | 0.0011        | 0.0002           | 0.0001           |
| % Sensitivity                 |                  |               |                                   |               |                 |                    |                 |                |               |                  |                  |
| (at 95% specificity)          | 31.579           | 5.263         | 68.421                            | 47.368        | 21.053          | 63.158             | 89.474          | 78.947         | 52.632        | 76.471           | 47.059           |
| Related cut-off               | 1347.67          | 51.27         | 1.47                              | 2.91          | 3.45            | 1804.60            | 63.80           | 20.00          | 16.70         | 92.00            | 232.20           |
| ROC (AUC)                     | 0.647            | 0.705         | 0.836                             | 0.804         | 0.592           | 0.805              | 0.952           | 0.897          | 0.917         | 0.841            | 0.908            |

The commercially available multiplex panel is considered to be dissatisfactory and incomplete from the point of view of marker choice. Many other biomarkers are developing from proteomic studies. Havrilesky *et al.* developed and demonstrated the utility of several multimarker algorithms for ovarian cancer screening and treatment monitoring encompassing HE4, MMP-7, serine leukocyte protease inhibitor-1 (SLP1), receptor for urinary-type plasminogen activator (PLAU-R), mucin 1, inhibin, glycodelin, PAI-1 and CA125 (10). Many other novel markers and panels of markers are being studied: *e.g.* haptoglobin, mesothelin, IL-8 and anti-IL-8 antibodies, transthyretin, APOA1, YKL40, total inhibin, vascular smooth muscle growth-promoting factor (VSGP/F-spondin) and others (11-15).

According to the presented results, HE4 protein seems to be the most promising single marker. The results correlate with HE4 studies indicating that HE4 is better than CA125 in distinguishing patients with malignant from those with benign ovarian disease at high specificity (16). It does not show satisfactory sensitivity as a single marker, but could be very useful as a member of a multiplex panel. Palmer *et al.* used multiplexed measurement of CA125, HE4 and mesothelin in their study along with another single assayed markers, but no marker combination did not possess significantly better results than CA125 (15).

IGF-II and OPN should be further studied in detail whether they are measured by common single assays or in multiplex. In concordance with our results, a simultaneous decrease of IGF-II and an increase of OPN in ovarian cancer was found (7, 8). Furthermore, significantly lower free IGF-II serum levels were observed in patients with breast tumour than in healthy controls contrary to those described in serum IGF-II up-regulation specific for cervical cancer (17, 18). Significantly

higher OPN levels in plasma in patients with epithelial ovarian cancer compared to healthy controls, benign ovarian disease and patients with other gynecological cancers have been observed in non-multiplex studies *e.g.* by Kim *et al.* (19). OPN in serum is bound to the complement factor H and serum levels were shown to be increased in prostate, breast and lung cancer in measurements performed after a disruption of the binding complex by Fedarko *et al.* (20). Novel studies, including the multiplex measurements, do not take into account the serum-binding of OPN and pre-assay complex disruption.

Benign ovarian cyst disease occurs in younger patients contrary to ovarian cancer, which is why the control group in this study was not exactly age-matched to the cancer group. Because no correlation between age and marker levels was observed, this age difference between groups is considered acceptable.

The discrepant values of CA125 obtained by multiplex measurement and by routine immunoassay, even if correlated, indicate that further validation with international standards is necessary for the multiplex assay.

Multiplex is a powerful tool in multimarker studies and in the future for multiparametric cancer disease diagnostics and monitoring, however, we are still in the era of seeking the right marker combinations. Several studies in which xMAP technology was used for cancer biomarker development have been published. A large study of 64 biomarkers in serum of patients with endometrial cancer and a control group has resulted in the establishment of a five-biomarker panel (PRL, growth hormone, eotaxin, E-selectin, and TSH) for discriminating endometrial cancer from ovarian and breast cancer (4). xMAP technology was also used to simultaneously test 29 biomarkers in the sera of patients with melanoma. Fifteen serum biomarkers showed differences between melanoma patients and a control healthy group. A multivariate

bioinformatics Bayesian network algorithm was used for discriminating between patients and controls and yielded 90% sensitivity at 98% specificity. (5). Furthermore, levels of 55 serum biomarkers were measured by Nolen *et al.* pre- and during neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer using eight different multiplexed panels. Multivariate statistical analysis revealed multibiomarker panels that were able to differentiate between treatment response groups (6).

From an analytical point of view, the tested commercially available multiplex panel fulfils all the requirements for further clinical research and in future clinical routine use, with satisfactory coefficients of variation and calibration curve ranges for measuring parameters in serum. However, from the clinical point of view, it is recommended that at least the novel HE4 tumour marker, and preferentially also non-specific markers for tumour mass or growth such as TPS, monototal or TK, are introduced into the panel.

The novel multiplex panel will be further tested on a larger ovarian cancer cohort and in patients with other types of cancer and non-cancerous diseases.

#### Acknowledgements

This study was supported by the research project VZ MSM 0021620819.

#### References

- Johnson CC, Kessel B, Riley TL, Ragard LR, Williams CR, Xu JL and Buys SS: The epidemiology of CA-125 in women without evidence of ovarian cancer in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer (PLCO) Screening Trial. Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Project Team. *Gynecol Oncol* 110(3): 383-389, 2008.
- Woolas RP, Conaway MR, Xu F, Jacobs IJ, Yu Y, Daly L, Davies AP, O'Brian K, Berchuck A, Soper JT *et al.*: Combinations of multiple serum markers are superior to individual assays for discriminating malignant from benign pelvic masses. *Gynecol Oncol* 59(1): 111-116, 1995.
- Kellar KL and Iannone MA: Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays. *Exp Hematol* 30(11): 1227-1237, 2002.
- Yurkovetsky Z, Ta'asan S, Skates S, Rand A, Lomakin A, Linkov F, Marrangoni A, Velikokhatnaya L, Winans M, Gorelik E, Maxwell GL, Lu K and Lokshin A: Development of a multimer panel for early detection of endometrial cancer. High diagnostic power of prolactin. *Gynecol Oncol* 107(1): 58-65, 2007.
- Yurkovetsky ZR, Kirkwood JM, Edington HD, Marrangoni AM, Velikokhatnaya L, Winans MT, Gorelik E and Lokshin AE: Multiplex analysis of serum cytokines in melanoma patients treated with interferon-alpha2b. *Clin Cancer Res* 13(8): 2422-2428, 2007.
- Nolen BM, Marks JR, Ta'san S, Rand A, Luong TM, Wang Y, Blackwell K and Lokshin AE: Serum biomarker profiles and response to neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Res* 10(3): R45, 2008.
- Visintin I, Feng Z, Longton G, Ward DC, Alvero AB, Lai Y, Tenthorey J, Leiser A, Flores-Saib R, Yu H, Azori M, Rutherford T, Schwartz PE and Mor G: Diagnostic markers for early detection of ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 14(4): 1065-1072, 2008.
- Mor G, Visintin I, Lai Y, Zhao H, Schwartz P, Rutherford T, Yue L, Bray-Ward P and Ward DC: Serum protein markers for early detection of ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(21): 7677-7682, 2005.
- Thorpe JD, Duan X, Forrest R, Lowe K, Brown L, Segal E, Nelson B, Anderson GL, McIntosh M and Urban N: Effects of blood collection conditions on ovarian cancer serum markers. *PLoS ONE* 2(12): e1281, 2007.
- Havrilesky LJ, Whitehead CM, Rubatt JM, Cheek RL, Groelke J, He Q, Malinowski DP, Fischer TJ and Berchuck A: Evaluation of biomarker panels for early stage ovarian cancer detection and monitoring for disease recurrence. *Gynecol Oncol* 110(3): 374-82, 2008.
- Gagnon A and Ye B: Discovery and application of protein biomarkers for ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 20(1): 9-13, 2008.
- Nossov V, Amneus M, Su F, Lang J, Janco JM, Reddy ST and Farias-Eisner R: The early detection of ovarian cancer: from traditional methods to proteomics. Can we really do better than serum CA-125? *Am J Obstet Gynecol* 199(3): 215-223, 2008.
- Tsigkou A, Marrelli D, Reis FM, Luisi S, Silva-Filho AL, Roviello F, Triginelli SA and Petraglia F: Total inhibin is a potential serum marker for epithelial ovarian cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 92(7): 2526-2531, 2007.
- Pyle-Chenault RA, Stolk JA, Molesh DA, Boyle-Harlan D, McNeill PD, Repasky EA, Jiang Z, Fanger GR and Xu J: VSGP/F-spondin: a new ovarian cancer marker. *Tumour Biol* 26(5): 245-257, 2005.
- Palmer C, Duan X, Hawley S, Scholler N, Thorpe JD, Sahota RA, Wong MQ, Wray A, Bergan LA, Drescher CW, McIntosh MW, Brown PO, Nelson BH and Urban N: Systematic evaluation of candidate blood markers for detecting ovarian cancer. *PLoS ONE* 3(7): e2633, 2008.
- Hellström I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, Ledbetter JA, Schummer M, McIntosh M, Drescher C, Urban N and Hellström KE: The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res* 63: 3695-3700, 2003.
- Singer CF, Mogg M, Koestler W, Pacher M, Marton E, Kubista E and Schreiber M: Insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II serum concentrations in patients with benign and malignant breast lesions: free IGF-II is correlated with breast cancer size. *Clin Cancer Res* 10: 4003-4009, 2004.
- Mathur SP, Mathur RS, Gray EA, Lane D, Underwood PG, Kohler M and Creasman WT: Serum vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) as a specific biomarker for advanced cervical cancer: Relationship to insulin-like growth factor II (IGF-II), IGF-binding protein 3 (IGF-BP3) and VEGF-A. *Gynecol Oncol* 98(3): 467-483, 2005.
- Kim JH, Skates SJ, Uede T, Wong KK, Schorge JO, Feltmate CM, Berkowitz RS, Cramer DW and Mok SC: Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. *JAMA* 287(13): 1671-1679, 2002.
- Fedarko NS, Jain A, Karadag A, VanEman MR and Fisher LW: Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate and lung cancer. *Clin Cancer Res* 7: 4060-4066, 2001.

Received October 24, 2008  
 Revised December 4, 2008  
 Accepted December 15, 2008

## C.

### **PHI in the Early Detection of Prostate Cancer**

Radka Fuchsova<sup>1</sup>, Ondrej Topolcan<sup>1</sup>, Jindra Windrichova<sup>1</sup>, Milan Hora<sup>2</sup>, Olga Dolejsova<sup>2</sup>, Ladislav Pecen<sup>1</sup>, Petr Kasik<sup>1</sup>, Jaroslav Novak<sup>1</sup>, Mirka Casova<sup>1</sup> Jiri Smejkal<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Nuclear Medicine, *Immunoanalytical Laboratory*, University Hospital and Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Urology, University Hospital in Pilsen, Pilsen, Czech Republic

### **Acknowledgements**

*This study is supported by the Ministry of Health of the Czech Republic - conceptual development of the University Hospital in Pilsen – FNPI research organization 00669806, SVV 260 054, IGA NT 13655-4 and OPVK CZ.1.07/2.3.00/20.0040.*

*Correspondence to:* Radka Fuchsova, MD, Immunoanalytical Laboratory, Department of Nuclear Medicine, University Hospital in Pilsen, Dr. E. Benese 13, CZ-305 99 Pilsen, Czech Republic. Tel: + 420 377401470, e-mail: fuchsovar@fnplzen.cz.

*Key words:* PSA, -2proPSA, PHI, prostate cancer, biopsy.

**Abbreviation of Running Title:** Fuchsova et al.: PHI in Prostate Cancer

“clinical”

**Date of submission:** 16.09. 2014

**Abstract.** *Aim: Evaluate changes in the serum levels of PSA, %freePSA and -2proPSA biomarkers and PHI in the diagnostic algorithm of early prostate cancer.*

***Patients and Methods:** The Immunoanalytical Laboratory of the University Hospital in Pilsen examined sera from 263 patients being treated at the hospital's Urology Department with suspected prostate cancer who had undergone TRUS biopsies and divided to benign and malignant group. The monitored biomarkers were measured using the chemiluminescent Dxl 800 instrument (Beckman Coulter, USA). All statistical analyses were calculated using SAS version 9.3 software. **Results:** We found statistically significant increased levels of -2proPSA, PHI and PSA and decreased levels of %freePSA in patients diagnosed with prostate cancer by prostate biopsy vs. patients with benign prostate hypertrophy (-2proPSA median 16 vs. 21 ng/L, PHI median 35 vs. 62, tPSA median 7.2 vs. 7.7 mg/L and %freePSA 16.7 vs. 11.7%). ROC curves show the best performance for PHI are compared to other markers. **Conclusion:** The assessment of -2proPSA and the calculation of PHI appear to be of great benefit for a more accurate differential diagnosis of benign hyperplasia and prostate cancer.*

Total PSA have limited specificity for detecting clinically significant prostate cancer and this low specificity leads to an excessive number of prostate biopsies – or to “overdiagnosis”(1,2). PSA testing has also resulted in an increase in the number of patients being diagnosed with low-grade, potentially clinically insignificant prostate cancer(3). In this study, we sought to establish whether determining -2proPSA (an isoform of free PSA) could help resolve the problem of “overdiagnosis”.

### **Patients and Methods**

In the period from November 2010 to April 2013, sera from 263 patients being treated at the University Hospital in Pilsen's Urology Department were tested. The mean age of the patients was 66.8 years (50-83 years). These patients were

suspected of having prostate cancer and underwent TRUS biopsies, with total PSA ranging from 0 to 20 mg/L. All patients were examined for total PSA (tPSA), freePSA (fPSA) and -2proPSA. All blood samples were taken before any diagnostic or therapeutic procedures involving the prostate and at least four weeks following prostate manipulation.

According to the prostate biopsy results, the patients were divided into two groups: 150 patients with benign prostatic hypertrophy (BPH) and 113 patients with prostate cancer (PCa).

Blood was taken from the cubital vein, collected in VACUETTE® blood collection tubes, (Greiner Bio-One, Austria) and processed according to Semjonow et al. (4). The serum was separated by centrifugation at  $1700 \times g$  for ten minutes and the samples were either processed immediately or, if they could not be used within three hours, stored at  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

PSA, freePSA and -2proPSA were determined using the Dxl 800 chemiluminescent device (Beckman Coulter, Brea, USA) and Hybritech calibration and calculated by using the formula of %freePSA ( $\text{freePSA} / \text{tPSA} \times 100$ ) and  $\text{PHI} = (-2\text{proPSA} / \text{freePSA}) \times \sqrt{\text{tPSA}}$ . The limit of detection is set at 0.008 mg/L for PSA, 0.005 mg/L for freePSA and 0.5 ng/L for -2proPSA.

The sensitivity, specificity, positive and negative predictive value (PPV, NPV) and the area under the receiver operating characteristic (ROC) curve (AUC) was established for all biomarkers. Wilcoxon's test for comparing the two groups of patients (benign disease and prostate cancer) and Spearman rank correlation were used. SAS statistical software version 9.3. (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used for all statistical calculations. A two-sided  $p$  value  $<0.05$  was considered significant.

## **Results**

Figure 1 shows the sensitivity and specificity for all observed tPSA, %fPSA and -2proPSA markers and PHI in ROC curves. PHI had highest AUC value and tPSA the lowest (Table I).

Table II shows the result parameters in both our groups, BPH and PCa, including statistical differences.

Table III depicts sensitivity and specificity for selected markers at important cut-offs.

The subsequent table (IV) provides an overview of 95% sensitivity and specificity.

The Spearman correlation shows that PHI did not differ with age ( $p=0.67$ ), which suggests that the use of the same PHI cut-offs may be applicable to males irrespective of age (PSA  $p=0.001$ , %fPSA  $p=0.004$  and -2proPSA  $p<.0001$ ).

## **Discussion:**

Our study shows the superiority of PHI as a combination of all three markers in increasing the sensitivity and specificity in diagnoses of prostate cancer. The AUC for PHI was 0.7945, which is a comparable result with data from other authors with similar inclusion criteria (5). But most authors were focused only on patients with tPSA levels in the grey zone, between 2 and 10 mg/L (6, 7, 8, 9, 10). Based on previous experience, we suggest that our data on patients with tPSA ranging up to 20 mg/L better matches standard urological practice in the Czech Republic, as tPSA between 10 and 20 mg/L with benign hypertrophy and relatively high prostate volume is no exception and these patients often undergo repeated biopsies.

Unfortunately, data from biopsy histology are distorted by the possibility of false negative biopsies(11) and this fact distorts the value of true negativities. This causes a very high cut-off of PHI at 95% specificity.

To broadly expand the application of new marker in routine practice, a reliable cut-off must be established. At present, we can rely on relatively strong evidence about PHI.

In fact we routinely use the cut-off of PHI 40 as positive, with a grey zone between 30 and 40. Fourteen per cent of all prostate cancer was found in the PHI interval of 30-40. Based our data, false negative PHI results and reliance on the relationship of sensitivity and specificity, we plan to reassess PHI and set >37 as positive. In our PCa group we had only 2 (1.8%) prostate cancer subjects with PHI below 30 and 11 (9.7%) prostate cancer subjects with PHI below 37.

This clinical approach can lead to a decrease in the number of negative biopsies on subjects with PHI below 37 and better indicate the timing of prostate biopsy if the PHI is above the cut-off. And PHI above 74 can push to repeat previous false negative biopsy (Table III).

### **Conclusion:**

Our results prove that the measurement of -2proPSA and calculation of PHI increase the reliability of differential diagnosis of prostate cancer. At the same time, based on our experience, this approach will lead to a reduction in the number of biopsies.

### **Acknowledgements**

*This study is supported by the Ministry of Health of the Czech Republic - conceptual development of the University Hospital in Pilsen – FNPI research organization, 00669806, SVV 260 054 and OPVK CZ.1.07/2.3.00/20.0040.*

### **References**

1 Moyer VA, U.S. Preventive Services Task Force: Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med* 157:120-134, 2012.



- 2 Heijnsdijk EA, der Kinderen A, Wever EM, Draisma G, Roobol MJ, de Koning HJ: Overdetection, overtreatment and costs in prostate-specific antigen screening for prostate cancer. *Br J Cancer* 101:1833-1838, 2009.
- 3 Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW: Prostate specific antigen: a decade of discovery--what we have learned and where we are going. *J Urol* 162:293-306, 1999.
- 4 Semjonow A, Kopke T, Eltze E, Pepping-Schefers B, Burgel H, Darte C Pre-analytical in-vitro stability of [-2]proPSA in blood and serum. *Clin Biochem* 43:926-928, 2010.
- 5 Lughezzani G, Lazzeri M, Larcher A, Lista G, Scattoni V, Cestari A, Buffi NM, Bini V, Guazzoni G: Development and internal validation of a prostate health index based nomogram for predicting prostate cancer at extended biopsy. *J Urol* 188:1144-1150, 2012.
- 6 Loeb S, Sokoll LJ, Broyles DL, Bangma CH, van Schaik RH, Klee GG, Wei JT, Sanda MG, Partin AW, Slawin KM, Marks LS, Mizrahi IA, Shin SS, Cruz AB, Chan DW, Roberts WL, Catalona WJ: Prospective multicenter evaluation of the Beckman Coulter Prostate Health Index using WHO calibration. *J Urol* 189:1702-1706, 2013.
- 7 Houlgatte A, Vincendeau S, Desfemmes F, Ramirez J, Benoist N, Bensalah K, Durand X Use of [-2] pro PSA and phi index for early detection of prostate cancer: a prospective of 452 patients. *Prog Urol* 22: 279-283, 2012.
- 8 Catalona WJ, Partin AW, Sanda MG, Wei JT, Klee GG, Bangma CH, Slawin KM, Marks LS, Loeb S, Broyles DL, Shin SS, Cruz AB, Chan DW, Sokoll LJ, Roberts WL, van Schaik RH, Mizrahi IA: A multicenter study of [-2]pro-prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for

prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml prostate specific antigen range. *J Urol* 185:1650-1655, 2011.

9 Lazzeri M, Haese A, de la Taille A, Palou Redorta J, McNicholas T, Lughezzani G, Scattoni V, Bini V, Freschi M, Sussman A, Ghaleh B, Le Corvoisier P, Alberola Bou J, Esquena Fernandez S, Graefen M, Guazzoni G: Serum Isoform [-2]proPSA Derivatives Significantly Improve Prediction of Prostate Cancer at Initial Biopsy in a Total PSA Range of 2-10 ng/ml: A Multicentric European Study. *Eur Urol* 63: 986-994, 2013.

10 Le BV, Griffin CR, Loeb S, Carvalhal GF, Kan D, Baumann NA, Catalona WJ : [-2]Proenzyme prostate specific antigen is more accurate than total and free prostate specific antigen in differentiating prostate cancer from benign disease in a prospective prostate cancer screening study. *J Urol* 183:1355-1359, 2010.

11 Serefoglu EC, Altinova S, Ugras NS, Akincioglu E, Asil E, Balbay MD: How reliable is 12-core prostate biopsy procedure in the detection of prostate cancer? *Journal of the Canadian Urological Association* 7:E293-E298, 2013.

Figure 1. ROC AUC shows the accuracy of totalPSA, -2proPSA, %freePSA and PHI for predicting PCa at biopsy.

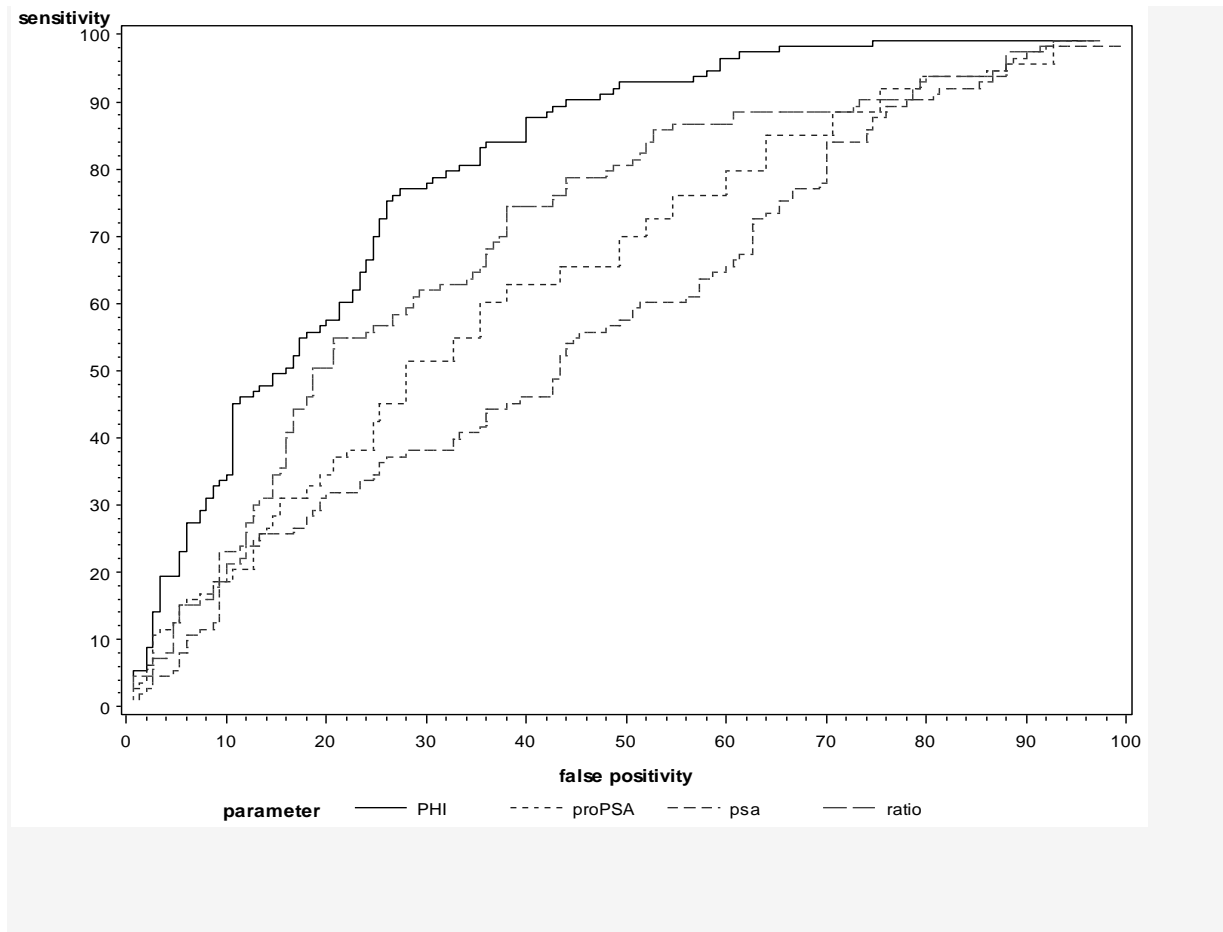


Table I. Areas under the curve for each marker.

| Parameter         | AUC     |
|-------------------|---------|
| PHI               | 0.79451 |
| ratio freePSA/PSA | 0.70062 |
| -2proPSA          | 0.62292 |
| PSA               | 0.57855 |

Table II. Serum levels of tumor markers according diagnosis and age characteristics.

| <b>Analyte<br/>(units)</b>          |                  | <b>PSA<br/>(mg/l)</b> | <b>-2proPSA<br/>(ng/L)</b> | <b>%freePSA<br/>(%)</b> | <b>PHI<br/>(-)</b>    |
|-------------------------------------|------------------|-----------------------|----------------------------|-------------------------|-----------------------|
| <b>Diagnosis</b>                    | <b>Count (N)</b> | Median<br>(Min – Max) | Median<br>(Min – Max)      | Median<br>(Min – Max)   | Median<br>(Min – Max) |
| <b>BPH<br/>benign<br/>histology</b> | 150              | 7.16<br>1.8-19.8      | 16.0<br>3.0-81.0           | 16.7<br>1.8-45.4        | 35.1<br>13.1-155.6    |
| <b>PCa malignant<br/>histology</b>  | 113              | 7.7<br>1.0-19.4       | 21.0<br>4.0-135.0          | 11.7<br>4.1-31.7        | 61.6<br>17.0-231.8    |
| <b>p value</b>                      |                  | 0.0407                | 0.0004                     | <.0001                  | <.0001                |

Table III. Basic parameters of ROC analysis at different cut-offs.

| <b>method</b> | <b>AUC</b> | <b>Cut-off</b> | <b>specificity</b> | <b>sensitivity</b> | <b>PPV</b> | <b>NPV</b> |
|---------------|------------|----------------|--------------------|--------------------|------------|------------|
| PHI           | 0.79451    | 30             | 30                 | 98                 | 51         | 96         |
|               |            | 37             | 53                 | 90                 | 59         | 88         |
|               |            | 40             | 63                 | 84                 | 63         | 84         |
|               |            | 74             | 90                 | 34                 | 72         | 64         |
| PSA           | 0.57855    | 4              | 11                 | 96                 | 45         | 80         |
|               |            | 10             | 79                 | 23                 | 53         | 60         |
| %freePSA      | 0.70062    | 15             | 61                 | 74                 | 59         | 76         |
|               |            | 20             | 30                 | 88                 | 49         | 77         |

Table IV. *Basic parameters of ROC analysis at 95% sensitivity and 95% specificity.*

| method | Cut-off | specificity | sensitivity | PPV | NPV |
|--------|---------|-------------|-------------|-----|-----|
| PHI    | 33      | 41          | 95          | 55  | 92  |
|        | 92      | 95          | 19          | 76  | 61  |
| PSA    | 4       | 11          | 95          | 45  | 80  |
|        | 17      | 95          | 5           | 46  | 57  |

**AUC: area under the curve; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value; PHI: prostate health index; PSA: prostate specific antigen; %freePSA: ratio of freePSA / totalPSA**

D.

**UNIVERZITA KARLOVA PRAHA  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI**

**BIOLOGICKÁ AKTIVITA NÁDORU  
ANEB PROČ STANOVOVAT  
BIOMARKERY V ONKOLOGII**

Autoři:

**Milena Roušarová, Šárka Svobodová,  
Ondřej Topolčan, Radek Kučera**

Editor:

**Doc. RNDr. Judita Kinkorová, Ph.D.**

*Sponsored by OP VK CZ.1.07/2.3.00/20.0040*

Autoři:

**MUDr. Milena Roušarová**

**MUDr. Šárka Svobodová, Ph.D.**

**MUDr. Miroslava Časová**

**Prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc Doc.**

**PharmDr. Radek Kučera**

**RNDr. Martin Pešta, Ph.D.**

**RNDr. Marie Karlíková, Ph.D.**

**Doc. RNDr. Judita Kinkorová, Ph.D.**

**Doc. MUDr. Juraj Kaušitz, CSc.**

ISBN 978-80-263-0814-0

---

---

## Kancerogeneze

---

Kancerogeneze je proces přeměny normálních buněk v buňky nádorové. Je to mnohastupňový proces postupné akumulace genetických a epigenetických událostí, které umožňují nádorovým buňkám selekční růstovou výhodu a vrcholí invazivním růstem a metastazováním.

### stádia kancerogeneze:

---

Iniciační stádium, tj. prvotní genetická událost, kdy dochází k mutaci kritického genu. Je to období časově velmi krátké, ale nevratné. Buňka tím získává potenciál maligní transformace. V tomto stádiu se může proces ještě zastavit.

Promoční stádium, které trvá léta až desetiletí. Klon postižených buněk je stimulován k intenzivní proliferaci promočními faktory Ty nejsou samy o sobě schopny vyvolat nádorovou transformaci, jen ji podpořit event.urychlit . Intenzita promočních mechanismů musí dosáhnout určitého stupně, aby byl iniciovaný klon stimulován. V této fázi se opět může proces kancerogeneze zpomalit nebo zastavit, ve většině případů však dojde k nástupu dalšího stadia.

Stádium progresu, dochází dalšímu postupnému nahromadění genetických změn. Nádor zpočátku zůstává v místě svého vzniku, pak vlivem aktivace dalších faktorů dochází k dalšímu šíření nádoru do okolí i do vzdálených míst (metastazování).

Proliferace buněk je velmi pečlivě řízena tak, aby odpovídala potřebám celého organismu. V časných stádiích života jedince kapacita množení buněk převažuje nad jejich zanikáním, v dospělosti je v dynamické rovnováze a ve stáří začíná převažovat involuce. Pro různé typy buněk je proces množení odlišný: např. buňky sliznice tenkého střeva nebo leukocyty se obnovují během několika dnů, erytrocyty mají životaschopnost 120 dnů. Hepatocyty či nervové buňky zanikají zřídka a nemají regenerační schopnosti vůbec. Pokud se však buňky vymknou kontrole replikace (tj. neodpovídají na vnější signály kontrolující proces dělení), změny se v buňky nádorové. Pokud si i přesto tyto buňky zachovají svůj vzhled i funkci a zůstávají na místě, kde vznikly, jsou to buňky benigní a dávají vznik benigním tumorům. Buňky, které ztratily většinu svých původních vlastností (ztráta diferenciací) a mají snahu pronikat dále do svého okolí (invazivita) i na vzdálená místa (metastazování), jsou buňkami maligními a dávají vznik maligním nádorům. Přeměna tkáně organismu do stavu invazivní nádorové choroby trvá v průměru 5 – 10 let a je ovlivněna hereditárními genetickými faktory a somatickými epigenetickými faktory.

### Tabulka č. 1. Průběh kancerogeneze

#### Průběh kancerogeneze

- Iniciační stádium
- Promoční stádium
- Stádium progresu
  - Lokální růst
  - Invaze do okolí
  - Metastazování

Vzhledem k tomu, že příčinou nádorových onemocnění bývá akumulace genetických změn v buněčných genech, zvyšuje se incidence těchto onemocnění především s přibývajícím věkem. Dochází (až na výjimky) k exponenciálnímu růstu incidence nádorového onemocnění v závislosti na věku <sup>(Pecan 2000)</sup>.

### **METASTAZOVÁNÍ:**

Pouze vysoce maligní buňky se vyznačují metastazujícím potenciálem. Aby mohly dále metastazovat, musí získat další invazivní vlastnosti, které jsou důsledkem dalších genových mutací, aktivace či inaktivace většího počtu genů. Proces metastazování je složitý mnohastupňový proces probíhající v následujících etapách (Viz Tabulka níže). V tabulce jsou uvedeny faktory, které se na jednotlivých etapách metastatického procesu podílejí.



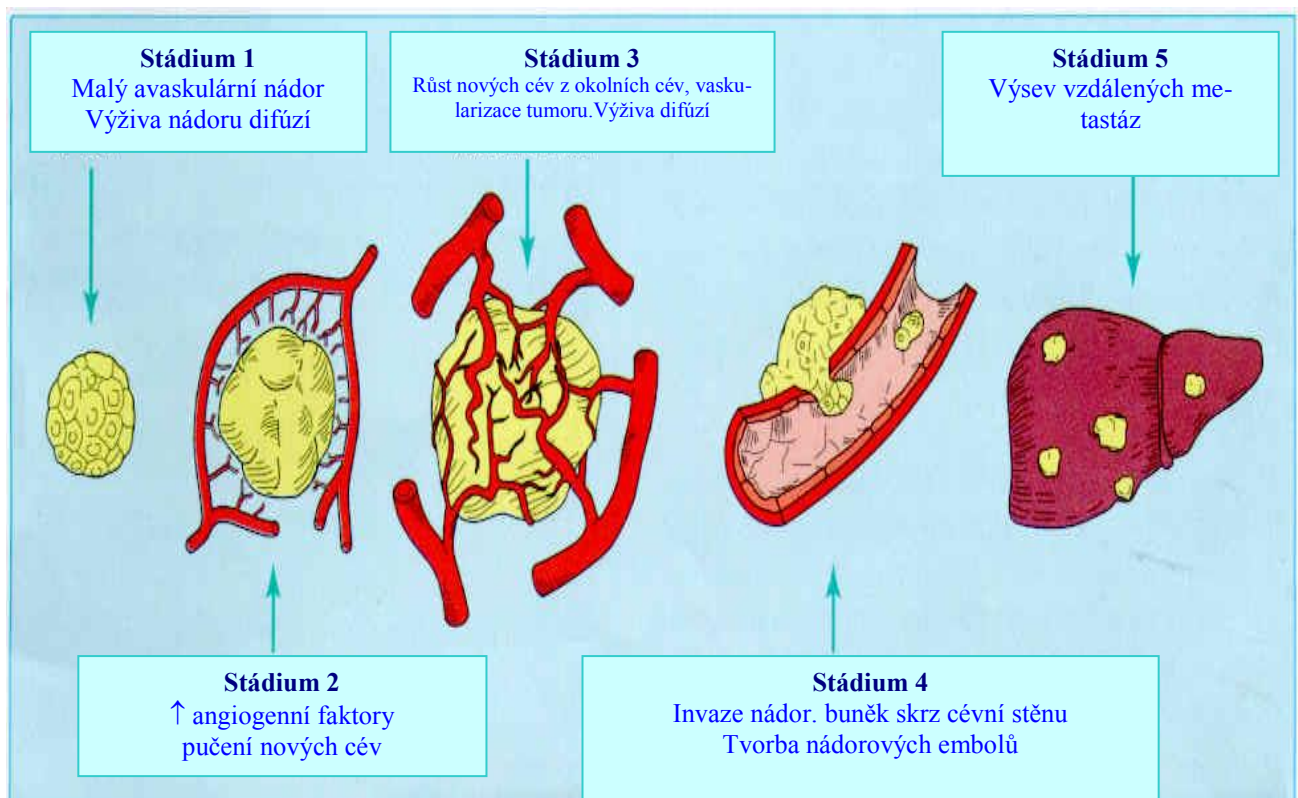
**Tabulka č. 2. Etapy metastatického procesu a faktory, které se na něm podílejí**

| <b>Etapa metastatického procesu:</b> | <b>Faktory:</b>  |
|--------------------------------------|--|
| <b>Invaze nádoru do okolí</b>        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Matrix metaloproteinázy</li> <li>• Angiogenetické faktory</li> <li>• Adhezivní molekuly</li> </ul>  |
| <b>Intravazální invaze</b>           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Matrix metaloproteinázy</li> <li>• Cysteinové a serinové proteázy</li> <li>• Angiogenetické faktory</li> <li>• Adhezivní molekuly</li> <li>• Hemokoagulační faktory</li> </ul>                  |
| <b>Transport nádorových buněk</b>    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pasivní transport.</li> <li>• Hemokoagulační faktory</li> </ul>   |
| <b>Extravazální invaze</b>           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Matrix metaloproteinázy</li> <li>• Cysteinové a setinové proteázy</li> <li>• Angiogenetické faktory</li> <li>• Adhezivní molekuly</li> <li>• Hemokoagulační faktory</li> </ul>                  |
| <b>Nidace nádorových buněk</b>       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hemokoagulační faktory</li> <li>• Adhezivní molekuly.</li> <li>• Proliferační faktory</li> <li>• Angiogenetické faktory</li> <li>• Adhezivní molekuly</li> <li>• Apoptotické faktory</li> </ul> |
| <b>Růst metastáz v nové tkáni</b>    |  |

## **INVAZE NÁDORU DO OKOLÍ**

Průnik nádorových buněk bazální membránou do extracelulární matrix vede k k narušení její integrity a tím mechanickou cestou při zvýšeném hydrostatickém tlaku uvnitř rostoucího nádoru invazi nádorových buněk do okolí. Na disrupci bazální membrány se podílí především proteolytické enzymy – matrix metaloproteinázy <sup>(Neslon 2000, Stevenson 1999)</sup>. Svým proteolytickým účinkem působí nejen na bazální membránu extracelulární matrix, ale i na bazální membránu endotelií, čímž usnadňují angiogenezi (novotvorbu cév) <sup>(Stevenson 1999)</sup> – viz Obr. č. 7, která je nezbytným faktorem invaze primárního nádorového ložiska a současně hraje roli i při vzniku vzdálených metastáz .

**Obrázek č. 1. Proces angiogeneze u nádorů** (Harris 1997)



## **INTRAVAZÁLNÍ INVASE**

Po průniku do extravazálního prostoru následuje další stupeň invazivity nádoru - intravazální invaze, na které se kromě metaloproteináz podílejí i další proteázy. Po průniku cévní stěnou dochází k aktivaci cytokininů (Banks 1993, Holubec 2002-2, Witting 1996) a k agregaci nádorových buněk s krevními elementy. Vznik těchto agregátů – mikrotrombů jednak usnadňuje transport buněk a jednak aktivuje hemokoagulační faktory, které jsou nezbytné pro extravazální invazi nádorových buněk.

## **TRANSPORT NÁDOROVÝCH BUNĚK**

Transport nádorových buněk v cévním řečišti je především pasivní děj, ale aktivací hemokoagulačních faktorů se připravuje extravazální invaze. (Duffy 2004-1, Duffy 2004-3)

## **EXTRAVAZÁLNÍ INVASE**

Extravazální invaze je zahájena hemokoagulačními faktory aktivujícími cytokininy, které aktivují adhezivní molekuly (Alexiou 2001), které zajistí adhezi na cévní stěnu. Z adhezaného agregátu krevních destiček a metastatických buněk se z trombocytů uvolňuje tromboxan A, který je zodpovědný za ireverzibilní agregaci, a tím definitivní adhezi mikrotrombu s nádorovými buňkami na cévní stěnu. Po ireverzibilní adhezi mikrotrombu následuje pochod obdobný první etapě metastatické kaskády, na které se podílejí matrix metaloproteinázy, faktory angiogeneze a další tkáňové působky. V této fázi metastatického procesu se připisuje významná úloha růstovému faktoru z trombocytů (PDGF), který stimuluje proliferaci buněk mikrometastázy. Větší odolnost mikroembolu je způsobena i tím, že se mikroembolus záhy obaluje fibrinem, který vzniká jako produkt plazmatické koagulace aktivované při agregaci destiček a indukované tromboplastickými substancemi z nádorových

buněk. Fibrinový obal chrání buňky mikrometastáz proti mechanické traumatizaci a maskuje nádorové buňky před imunokompetentními lymfocyty.

## ***NIDACE NÁDOROVÝCH BUNĚK A RŮST METASTÁZ V NOVÉM MIKROPROSTŘEDÍ***

Po průniku nádorových buněk cévní stěnou růst metastáz v novém mikroprostředí neprobíhá uniformně (Alexiou 2001, Amaya 1997, Aotake 1999). Buňky v metastáze se mohou diferencovat, jindy mohou zůstat dlouhou dobu v klidovém stavu, aniž ztratí svůj proliferační potenciál.

Proliferace buněk v metastáze je závislá na přítomnosti rozmanitých růstových (proliferačních) faktorů a jejich vzájemném poměru s faktory, které proliferaci inhibují.

Rovněž inhibice apoptózy (programové smrti buněk) má za následek intenzivnější proliferaci (Aotake 1999).

Kromě již zmíněného PDGF se na proliferaci mikrometastáz mohou podílet též humorální faktory produkované vlastními nádorovými buňkami (tzv. autokrinní stimulace). Uplatňují se též různé produkty onkogenů, zejména c-myc, c-erb a c-sic, které mají aktivitu růstových faktorů (FGF, TGF $\alpha$ , EGF) (Dirix 1999).

Předpokladem růstu metastázy je též plynulý přísun živin a kyslíku, a proto je pro růst metastázy opět nezbytná novotvorba cév (Carmeliet 2000). Pro vlastní cévní zásobení metastáz je též nezbytná produkce fibrinu, který vytváří matrici, jež je oporou novotvořeným cévám, na které metastatické ložisko dále roste.

### ***Určení biologické aktivity nádoru má velký význam pro:***

- stanovení etiopatogeneze nádoru
- diagnostiku nádorového onemocnění
- monitoraci průběhu nádorového onemocnění, volbu a monitoraci léčby a vývoj nových terapeutických postupů (ASCO 2000, Duffy 2003)

Trendem současného výzkumu je nejen snaha o komplexní charakteristiku příčin vzniku nádorového bujení, ale především podrobná charakteristika agresivity nádorového procesu a s úzce související i mnohastupňové kaskády metastatického procesu (Ghesani 2003). Podrobný popis efektorových genů a jejich proteinových produktů (Kment 1999, Krause 2001, Vogelstein 1988), které ovlivňují jednotlivé pochody metastatické kaskády má nejen velký význam pro včasnou diagnostiku možné invaze nádoru do okolí a tvorbu distančních metastáz, ale především pro vývoj nových terapeutických postupů, které v budoucnu umožní přechod od léčby empirické k léčbě kauzální. V praxi to znamená přechod od léčebných postupů, které vedou k pouhému zastavení buněčného dělení či buněčného růstu, k ovlivnění jednotlivých fází nádorového vývoje (korekce genetického defektu nádorových buněk, inhibice metastatické kaskády, inhibice angiogeneze, apod.). Cílem podrobného poznávání charakteristiky jednotlivých nádorových onemocnění je snaha o individualizaci přístupu, zlepšování kvality života a prodloužení přežívání onkologicky nemocných.

Za účelem pochopení významu nádorových markerů ve vývoji a diagnostice nádorového bujení je v této kapitole rozebírán nádorový proces v širších souvislostech.

Vznik nádoru je předurčen vznikem prvé nádorově transformované buňky v jinak zdravé tkáni. Ta vzniká v důsledku mutace nebo strukturálních změn genetické výbavy buňky. Výsledkem je nekontrolovatelná aktivita onkogenů a porucha regulačního vlivu onkosupresorických genů. Tak dochází ke klonální proliferaci, kdy z jedné nádorové buňky vzniká nádorové ložisko. Pokud nádorové buňky nemají schopnost invazivního růstu

a metastazování, pak vede klonální proliferace primárně transformované buňky ke vzniku benigního nádoru. Teprve genetické a fenotypické změny, které dále mění vlastnosti již existujících a množících se nádorových buněk tak, že jsou schopné invazivně prorůst do okolní tkáně nebo do cévního řečiště, umožní vznik skutečně zhoubného nádoru. Jedním z typických podrobně prozkoumaných a většinou často používaných příkladů je vznik kolorektálního karcinomu.

## MODELOVÝ PŘÍKLAD KANCEROÉGENEZE

### Vznik kolorektálního karcinomu –

Nádory tlustého střeva a rektu můžeme rozdělit na sporadické a familiární (hereditární) formy. **Sporadická forma** (asi 80 % všech nádorů kolorekta) se vyznačuje kompletním vyřazením obou alel důležitého genu z funkce, nicméně k této změně je třeba ještě vzniku *dvou mutací v somatické buňce*. Pravděpodobnost tohoto jevu je poměrně malá a takto způsobené nádory vznikají ve vyšším věku. Naproti tomu při **familiární formě** (20 % všech nádorů kolorekta) je zárodečná mutace přítomna ve všech buňkách jedince <sup>(Witting 1996)</sup>. Druhá alela genu má normální funkci a rozvoj nádorového bujení se projeví až tehdy, když je vyřazena somatickou mutací i druhá kopie identického genu a dojde k poruše regulace buněčného cyklu či opravě chyb deoxyribonukleové kyseliny (DNA). U hereditární formy nádorového onemocnění tedy stačí k vyřazení genu pouze jediná mutace somatické buňky. Pravděpodobnost takové mutace je vysoká. Vznik nádorů se tak posouvá se do mladého věku.

Genetický model vzniku kolorektálního karcinomu byl detailně vypracován Vogelsteinem v roce 1988 <sup>(Vogelstein 1988)</sup> a je uváděn jako typický příklad vzniku a vývoje nádorového onemocnění. Pro vznik nádorového onemocnění musí dojít ke kumulaci následujících změn <sup>(Kaušitz 2003, Masopust 2003, Vogelstein 1988)</sup>. Ke genetickým změnám (mutacím) vedou mutageny, kterými mohou být rozličné exogenní faktory. Mutací pozměněné geny jsou navíc citlivější na změny zevního prostředí. **Protoonkogeny** jsou normální geny, které mohou být aktivovány mutací jedné alely. Takto aktivované protoonkogeny se nazývají **onkogeny**. Narušují normální buněčný růst a celulórní diferenciaci. U kolorektálního karcinomu svědčí řada údajů o velkém významu mutace **K ras genu** při vzniku dysplázií a v kancerogenezi. **K ras gen** je nejčastějším onkogenem. **Tumorsupresorové geny** (*antionkogeny*), respektive jejich proteinové produkty, kontrolují normální buněčnou proliferaci a diferenciaci. Při selhání této kontroly přejde diferenciaci normálních kolonocytů do nádorové transformace. Ztráta funkce (inaktivace) při velké chromozomální aberaci obou kopií supresorových genů (otcovské a mateřské) má závažný význam v kancerogenezi kolorektálního karcinomu. Jde především o **gen p 53** (na *p 17*), **APC gen** (na *q 5*) a **DCC gen** (na *q 18*). Ztráta heterozygosity (mutace a delece) těchto genů se zásadně podílí na přeměně adenomu v karcinom a na vývoji malignity. Tyto změny jsou zjizitelné až u 70 – 80 % kolorektálních nádorů. Sekvenci jednotlivých změn vedoucích ke vzniku kolorektálního karcinomu znázorňuje Vogelsteinův model tumorigeneze lidského kolorektálního karcinomu <sup>(Vogelstein 1988)</sup> na obrázku níže.

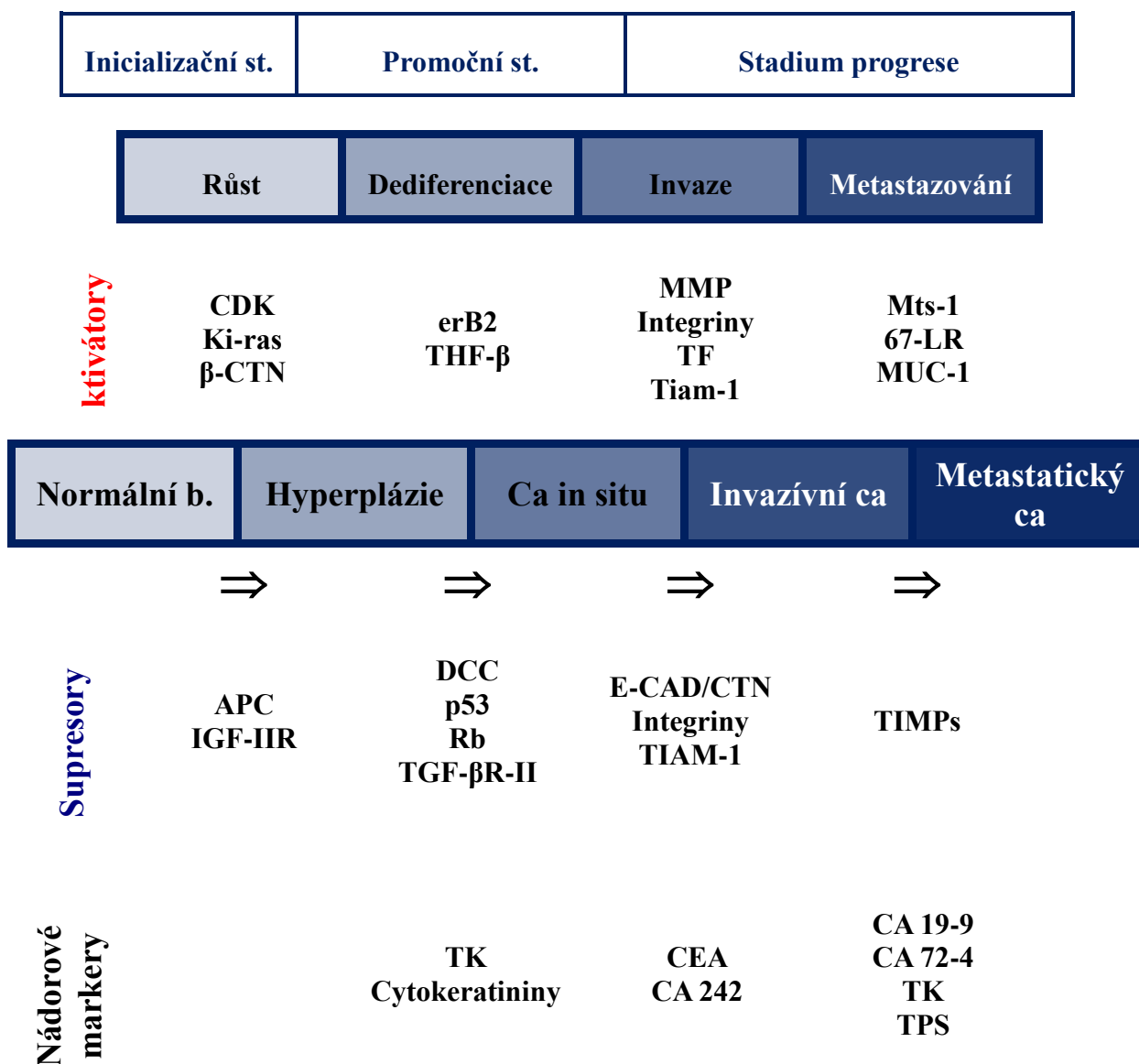
**Obrázek č.2. Vogelsteinův model tumorigeneze kolorektálního karcinomu**

|  |   |                                   |
|--|---|-----------------------------------|
|  |   | <b>Normální epitel</b>            |
| <b>Mutace APC genu</b><br>(Chromozom 5q, 9q) | ⇒ | ⇓                                 |
|  |   | <b>Aberantní kryptový fokus</b>   |
| <b>Hypomethylace DNA</b>                     | ⇒ | ⇓                                 |
|  |   | <b>Adenom – lehká dysplázie</b>   |
| <b>Mutace K ras</b><br>(Chromozom 12p)       | ⇒ | ⇓                                 |
|  |   | <b>Adenom – střední dysplázie</b> |
| <b>Ztráta DCC</b><br>(Chromozom 18q)         | ⇒ | ⇓                                 |
|  |   | <b>Adenom – těžká dysplázie</b>   |
| <b>Ztráta p53</b><br>(Chromozom 17p)         | ⇒ | ⇓                                 |
|  |   | <b>Karcinom</b>                   |
| <b>Jiné alterace</b><br>(delece 1p)          | ⇒ | ⇓                                 |
|  |   | <b>Metastázy</b>                  |

## **MALIGNÍ TRANSFORMACE BUŇKY**

Množení buněk je velmi pečlivě řízeno tak, aby odpovídalo potřebám celého organismu. V časných stádiích života jedince kapacita množení buněk převažuje nad jejich zanikáním, v dospělosti je v dynamické rovnováze a ve stáří začíná převažovat involuce. Pro různé typy buněk je proces množení odlišný: např. buňky sliznice tenkého střeva nebo leukocyty se obnovují během několika dnů, erytrocyty mají životaschopnost 120 dnů. Hepatocyty či nervové buňky zanikají zřídka a nemají regenerační schopnosti vůbec. Pokud se však buňky vymknou kontrole replikace (tj. neodpovídají na vnější signály kontrolující proces dělení), změny se v buňky nádorové. Pokud si i přesto tyto buňky zachovají svůj vzhled i funkci a zůstávají na místě, kde vznikly, jsou to buňky benigní a dávají vznik benigním tumorům. Buňky, které ztratily většinu svých původních vlastností (ztráta diferenciace) a mají snahu pronikat dále do svého okolí (invazivita) i na vzdálená místa (metastazování), jsou buňkami maligními a dávají vznik maligním nádorům. Maligní nádor je v podstatě genetické onemocnění, jeho exprese začíná v jediné buňce. Jde o několikastupňový proces, kdy na úrovni chromozomů dochází k postupnému nahromadění mutací (alterací) genů, kontrolujících proliferaci (buněčné dělení), diferenciaci a zánik buněk. Přeměna tkáně organismu do stavu invazivní nádorové choroby trvá v průměru 5 – 10 let. Ovlivňují to hereditární genetické faktory a somatické faktory epigenetické.

**Obrázek 4. Schématické znázornění jednotlivých etap kancerogeneze a produkce nádorových markerů v jednotlivých etapách kolorektálního karcinomu.**



*Vysvětlivky: CDK = cyklin dependentní kinázy; Ki-ras = onkogen Kirstenova sarkomového viru; β-CTN = β catenin, erB2 = onkogenní tyroxin kináza (ze skupiny EGFR); THF-β = transforming growth factor β; MMP = metaloproteinázy; TF = tkáňový faktor – aktivátor invazivity; Tiam-1 = aktivátor invazivity u lymfomových buněk a inhibitor invazivity u epiteliálních buněk; mts1 = gen kódující proteiny vázající kalcium; LR67 = lamininový receptor; MUC-1 = mucin stimulující adhezi nádorových buněk k endoteliálním buňkám; APC = protein adenomatózní polypózy tlustého střeva, IGF-IIR = inzulin-like growth factor II receptor; DCC = deleted in colorectal cancer, kódující transmembránový glykoproteid imunoglobulinů; p53 = jaderný protein tlumící replikaci poškozené DNA; Rb = retinoblastoma protein kódující fosfoprotein, který se podílí na regulaci buněčného cyklu; TGF-βR-II = typ II receptor pro TGF-β; E-CAD/CTN = E-cadherin/cateninový komplex.*

# VYUŽITÍ STANOVENÍ UKAZATELŮ BIOLOGICKÉ AKTIVITY NÁDORU PRO KLINICKOU PRAXI A VÝZKUM

## Diagnostické využití stanovení ukazatelů biologické aktivity *in vitro*

### *Rozdělení a obecná charakteristika parametrů biologické aktivity*

Nádorové markery lze charakterizovat jako látky produkované maligními buňkami či organismem jako odpověď na nádorové bujení. Může se jednat o antigeny lokalizované na povrchu buněčných membrán, obsažené v cytoplazmě, solubilní antigeny obsažené v biologických tekutinách, enzymy metabolických drah či fragmenty cytoplazmatických struktur uvolňované do okolí při zániku buněk. Celulární nádorové markery lze detekovat imunohistochemicky či v cytozolu nádorové buňky, humorální nádorové markery cirkulující v krvi či v jiných biologických tekutinách a lze je prokázat pomocí imunoanalytických metod.

Přestože diagnostický práh nádorových markerů umožňuje v příznivých případech detekovat nádor o hmotnosti 1mg ( $10^6$  nádorových buněk), zatímco klinická diagnóza je určena většinou až u nádoru, který obsahuje asi  $10^9$  buněk, neexistuje dosud vzhledem k širokému spektru nádorových onemocnění univerzální nádorový marker.

Požadavky kladené **na ideální nádorový marker** jsou následující:

- je produkován pouze u maligních onemocnění
- je orgánově specifický
- vyskytuje se ve vysokých koncentracích v biologických tekutinách
- koreluje s velikostí nádoru
- koreluje se stádiem onemocnění
- koreluje s prognózou
- koreluje s účinností terapie

V klinické praxi neexistuje v současné době žádný nádorový marker, který by tato kritéria splňoval. Je proto nutné si vždy uvědomit optimální indikace a současně i limitace těchto vyšetření. Správně indikované vyšetření nádorových markerů může přispět především k včasnému zachytu recidivy či progresu onemocnění a tím i k rychlejšímu terapeutickému zákroku, který může prodloužit život nemocného. Orgánová specifita při vyšetřování nádorových markerů je nízká, a proto je nezbytně nutné jejich dynamické sledování v pravidelných intervalech.

Indikace vyšetření nádorových markerů u karcinomu tlustého střeva mají své limitace. Jedná se o doplňkovou diagnostickou metodu. Pro správnou interpretaci výsledků je proto nezbytná nejen správná volba nádorových markerů, ale především způsob jejich klinického vyhodnocení, které vyžaduje úzkou interdisciplinární spolupráci mezi klinikem a laboratorním pracovníkem.

U nádorů tlustého střeva a konečníku je hlavním stanovovaným markerem karcinoembryonální antigen (CEA). Jako marker druhé volby je doporučován CA 19-9. Jako optimální se jeví kombinace těchto dvou markerů. K dalším markerům, které jsou studovány v souvislosti s kolorektálním karcinomem patří CA 72-4, dále pak další nádorové markery CA typu (CA 242, CA 195), markery cytokeratinu (TPA, TPS) a řada dalších. V přehledné Tabulce č. 5 jsme se zaměřili na nejčastěji vyšetřované nádorové markery v klinické praxi obecně.



**Tabulka č. 3. Rozdělení nádorových markerů podle funkce:**

| Skupina markerů:                    |                                 | Jednotlivé markery.   |
|-------------------------------------|---------------------------------|---|
| Onkofetální a mucinózní antigeny    | Mající funkci u plodu           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• CEA</li> <li>• AFP</li> <li>• hCG</li> <li>• SP1</li> </ul>  |
|                                     | Karbohydrátové(cancer) antigeny | <ul style="list-style-type: none"> <li>• CA 125</li> <li>• CA 15-3</li> <li>• CA 19-9</li> <li>• CA 50</li> <li>• CA 72-4</li> </ul>  |
| Cytokeratinové nádorové markery     |                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• TPA</li> <li>• TPS</li> <li>• CYFRA 21.1</li> <li>• SCC</li> </ul>   |
| Enzymy                              | Proliferační                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Neuronspecifická enoláza</li> <li>• Thymidinkináza</li> </ul>  |
|                                     | Ostatní                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Prostatický specifický antigen</li> <li>• Kyselá prostatická fosfatáza</li> <li>• Laktátdehydrogenáza</li> </ul>                       |
| Hormony                             | Ektopická sekrece               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Adrenokortikotropní hormon</li> <li>• Antidiuretický hormon</li> <li>• Kortizon</li> <li>• Parathormon</li> <li>• Prolaktin</li> </ul> |
|                                     | Produkované nádorem             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Placentární laktogen</li> <li>• Kalcitonin</li> <li>• Parathormon</li> <li>• Prolaktin</li> </ul>                                      |
| Receptory                           |                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estrogenové</li> <li>• Progesteronové</li> </ul>   |
| Ostatní blíže nespecifikované látky |                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Feritin</li> <li>• <math>\beta_2</math>-mikroglobulin</li> <li>• Imunoglobuliny</li> </ul>   |

Většina nádorových markerů patří mezi **onkofetální antigeny**. Jde o látky, které nacházíme v poměrně vysokých koncentracích u plodu, kde se vyskytují na povrchu diferencujících se buněk (diferenciační antigeny) a hrají významnou roli ve vývoji plodu. U zdravých dospělých osob je jejich hladina velice nízká a přesná biologická funkce není známa. Při většině nádorových onemocnění se jejich aktivita výrazně zvyšuje. Typické pro ně je, že se vyskytují především u dobře diferencovaných nádorů a jejich hladina většinou koreluje s velikostí nádorové masy. Jejich stanovení má význam zejména pro určení prognózy nádorového onemocnění a kontrolu terapie.

**Cytokeratinové** nádorové markery jsou markery vzniklé narušením nebo nekontrolovaným růstem cytoskeletu buňky. Vyskytují se jako o cirkulující fragmenty nebo komplexy fragmentů cytokeratinů 8, 18, 19 normálního epitelu. Souvisejí výrazně s buněčnou proliferací a mnozí autoři je řadí mezi proliferační nádorové markery.

**Enzymatické** nádorové markery jsou po onkofetálních antigenech druhým nejčastěji užívanou skupinou nádorových markerů. Můžeme je rozdělit na dvě podskupiny. První podskupinu tvoří enzymy mající biologickou funkci především při buněčném dělení, (např. thymidinkináza a neuron-specifická enoláza). Tyto markery jsou značně zvýšené u všech stavů charakterizovaných především výraznou buněčnou proliferací. Proto se uplatňují při určování prognózy a stadia onemocnění. Markery druhé podskupiny jsou enzymy, které se vyskytují i ve zdravých tkáních, kde plní své biologické funkce. Tyto markery jsou vysoce orgánově či tkáňově specifické, ale neposkytují jakoukoliv informaci o typu poškození daného orgánu či tkáně. Dají se použít k určení primární lokalizace nádoru.

Dalším typem nádorových markerů jsou **hormóny**. Jsou produkovány buď přímo samotnými endokrinními buňkami (např. kalcitonin medulárním karcinomem štítné žlázy nebo tyreoglobulin při typu folikulárním) nebo jsou produkovány ektopicky (např. látka podobná ACTH nebo hCG při bronchogenním karcinomu). Tyto nádorové markery jsou nečastěji využívány ke kontrole efektu ať již operační či medikamentózní léčby.

U nádorů hormonálně aktivních se stanovují i počty **receptorů**. Na rozdíl od předchozích markerů, které se převážně stanovují v séru, jde o markery tkáňové, které se stanovují v bioptickém materiálu. Mají jednak význam pro určení prognózy nádoru, ale rozhodující význam mají pro volbu a kontrolu terapie (jako např. u nádorů prsu).

Poslední skupinu nádorových markerů tvoří nejrůznější tkáněmi produkované **blíže nespecifikované látky**, které se nedají zařadit do žádné z předchozích skupin, ale při nádorovém bujení se jejich hladiny v krvi zvyšují jako nespecifická reakce organismu na přítomnost nádorového onemocnění (ferritin,  $\beta_2$ -mikroglobulin, imunoglobuliny).

## **PŘEHLED LITERATURY**

- Alexiou, D., Karayiannakis, A.J., Syrigos, K.N., Zbar, A., Kremmyda, A., Bramis, I., Tsigris, C. Serum levels of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in colorectal cancer patients: correlations with clinicopathological features, patient survival and tumour surgery. *Eur J Cancer*, 2001, Dec, 37(18), p. 2392-2397.
- Amaya, H., Tanigawa, A., Lu, C., Matsumura, M., Shimomatsuya, T., Horiuchi, T., Muroaka, T. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor

- angiogenesis, survival and thymidin phosphorylase/platelet derived endothelial cell growth factor expression in human colorectal cancer. *Cancer Lett* 1997, 119, s. 227-235.
- Aotake, T., Cai De, L., Chiba, Y. Changes of Angiogenesis and Tumor Cell Apoptosis during Colorectal Carcinogenesis. *Clin Cancer Research* 1999, 5, p. 135-142.
- ASCO special article: 2000 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast and Colorectal Cancer. *Clinical practice guidelines of the American society of clinical oncology*.
- Banks, RE., Gearie, AJH., Heminway, IK., Norfolk, DR., Perren, TJ., Selby, PJ. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. *Br J Cancer* 1993, 68, p. 122-124.
- Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6: 389-395.
- Dirix, L. Y., Vermeulen, p. b., Hubens, G. et al. Serum basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and tumour growth kinetic in advanced colorectal cancer. *Ann. Oncol.*, 1999, 7, p. 843-848.
- Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, Nilsson O, Sturgeon C, Topolcan O. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines *Eur J Cancer*. 2003 Apr;39(6):718-27. Review.
- Duffy MJ. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr Pharm Des*. 2004;10(1):39-49. Review
- Sep;41(Pt 5):370-7.
- Duffy MJ, Duggan C. The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer *Clin Biochem*. 2004 Jul;37(7):541-
- Ghesani M, Belgraier A, Hasni S. Carcinoembryonic antigen (CEA) scan in the diagnosis of recurrent colorectal carcinoma in a patient with increasing CEA levels and inconclusive computed tomographic findings. *Clin Nucl Med*. 2003 Jul;28(7):608-9.
- Holubec, L.jr, Topolčan, O., Fínek, J., Pikner, R., Pecen, L., Lipská, L., Holubec, L.sen., Visokai, V. The role of VCAM, ICAM, Selectin E and Selectin P in detection of liver metastases of colorectal carcinoma. *Tumor Biology* 23(S1): 51, 2002
- Kaušitz, J. et al.: *Onkológia*. Veda, 2003.
- Kim JCh., Hwang DY. et al.: Changes of Serum CEA in Patients with Colorectal cancer. *Journal of Korean Cancer Ass.*, 1992, 880-885.
- Kment, M., Hajer, J. *Genetika*. Postgraduální medicína 1999, 2, 75-78.
- Krause, WF., DuBois, RN. The molecular basis for prevention of colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2001, May;1(1), p. 47-54.
- Masopust J. et al.: *Patobiochemie* buňky. 2003. ISBN: 80-239-1011-0.
- Nelson, AR., Fingleton, B., Rothenberg, LM., Matrisian, LM. Matrix Metalloproteases: Biologic Activity and Clinical Implications. *J Clin Oncology* 2000, 18(5), p. 1135-1149.
- Pecen, L., Topolčan, O., Koukalová, H., Novák, J., Široký, P., Roušarová, M., Holubec L.jr., Pikner, R., Svobodová Š. Epidemiology of colorectal carcinoma in the Czech Republic. *J Tumor Marker Oncology*, 2000, 15(1), p. 55-56.
- Stevenson, SGW. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J of Clin Invest* 1999, 103, p. 1237-1241.
- Vogelstein, B., Fearon, ER, Hamilton, srov. et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *A Engl J Med* 1988, 319, p. 525-32.
- Witting, BM., Kaulen, R., Thees, R., Schmitt, P., Knolle, P., Stock, J., Meyer, KH., Dippold, W. Elevated Serum E-selectin in Patients with Liver Metastases of Colorectal Cancer. *European J Cancer* 1996, 32(7), p. 1215-1218.



**UNIVERZITA KARLOVA PRAHA  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI**

**VYUŽITÍ BIOMARKERŮ PRO DIAGNOSTIKU A MO-  
NITORACI LÉČBY KARCINOMU VAJEČNÍKŮ**

**Autoři**

**Presl Jiří, Kučera Radek , Topolčan Ondřej ,  
Novotný Zdeněk**

**Editor:**

**Doc. RNDr. Judita Kinkorová, Ph.D.**

*Sponsored by OP VK CZ.1.07/2.3.00/20.0040*

**Autoři :**

**MUDr. Jiří Presl Ph.D.**

**PharmDr. Radek Kučera, Ph.D.**

**Prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc**

**MUDr. Šárka Svobodová, Ph.D.**

**Doc. MUDr. Zdeňek Novotný, CSc.**

**RNDr. Jindra Windrichová Ph.D.**

**MUDr. Miroslava Čásová**

**MUDr. Radka Fuchsová**

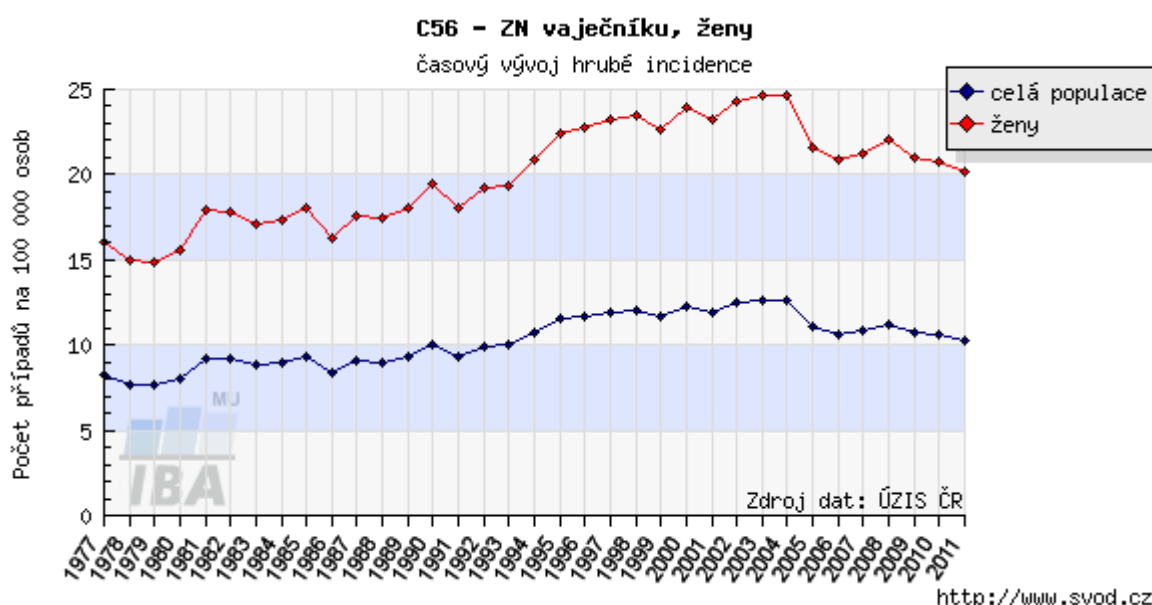
**MUDr. Lucie Betincová**

**ISBN 978-80-263-0816-4**

## Epidemiologie

Dle údajů NOR – Národního onkologického registru, incidence ovariálních zhoubných nádorů v České republice v 90. letech minulého století stoupala a v roce 2002-2003 dosáhla nejvyšší hodnoty 24,9 na 100 000 žen. Tato incidence byla identická i v následujícím roce. V roce 2005 jsme zaznamenali pokles mírně pod 22/100000 a v následujícím roce 2006 kolem 21/100000, což byla dosud nejnižší evidovaná incidence v ČR. Poslední data jsou t.č. dostupná za rok 2011, kdy byla incidence 20,2/100000(1).

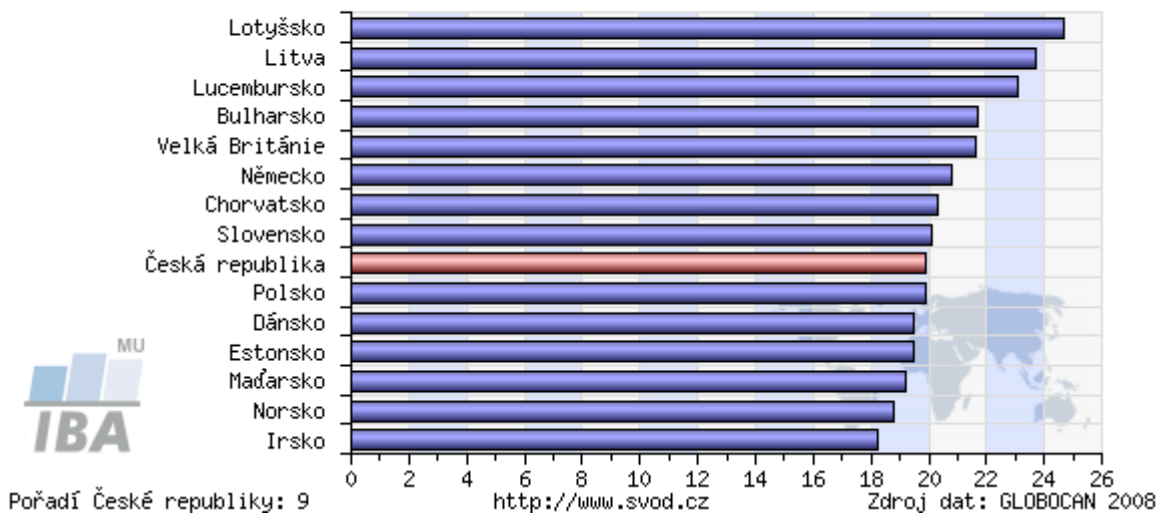
### Časový vývoj hrubé incidence



V zemích západní Evropy, kde se masivně používá hormonální antikoncepce déle než 20 let, začíná incidence klesat.

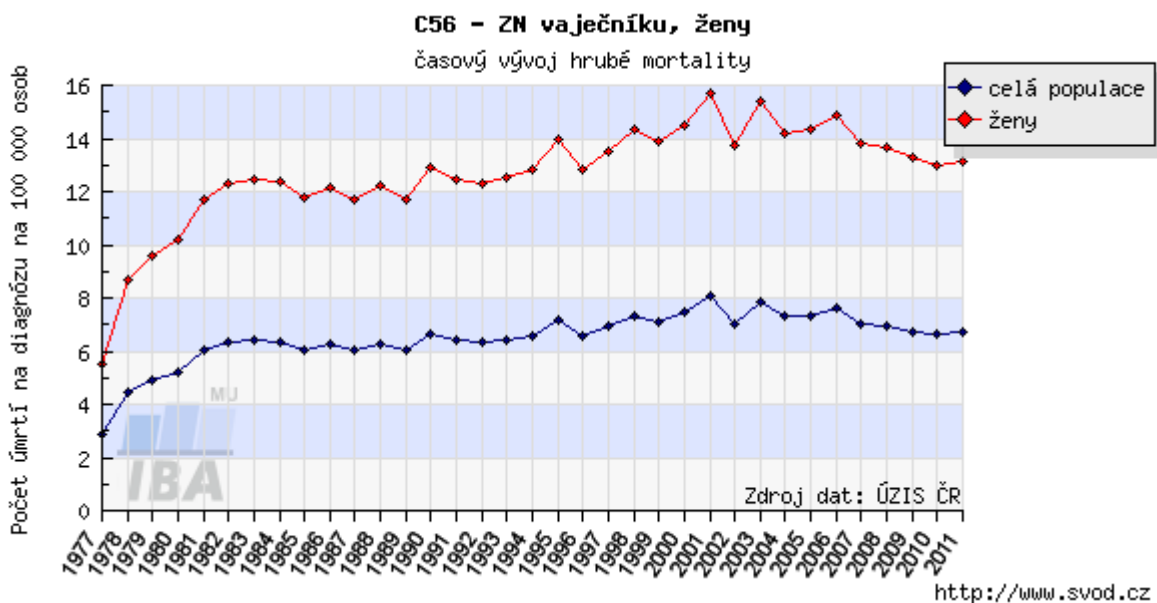
### C56 - Vaječník, ženy

srovnání incidence v ČR s ostatními zeměmi světa, přepočet na 100 000 osob

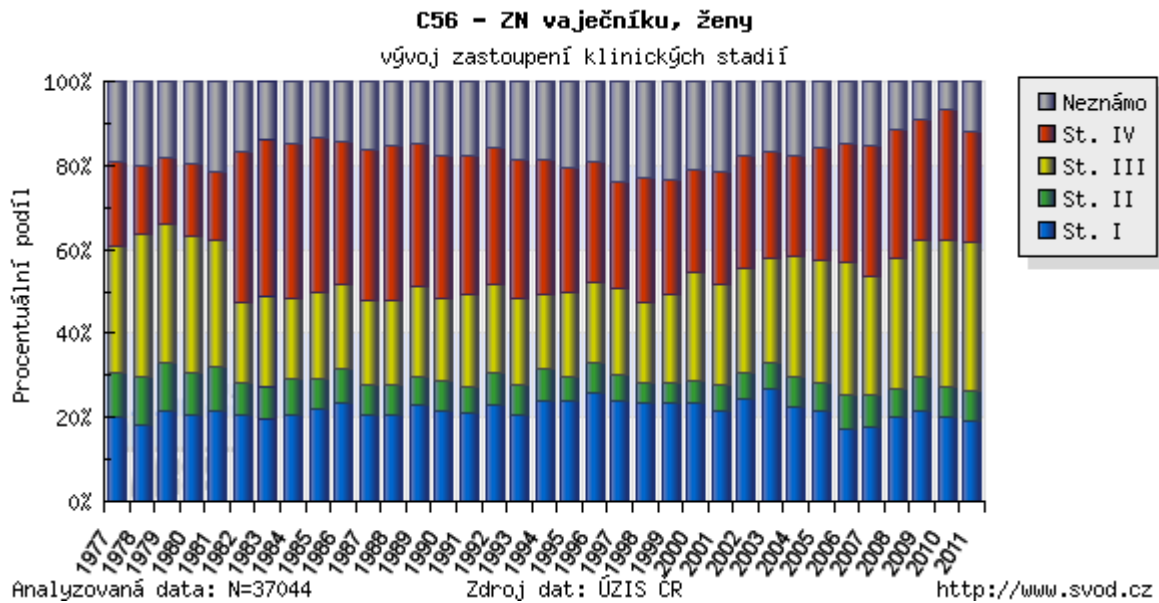


Mortalita je i přes pokles (za poslední 10 let poklesla incidence cca o 10 %) stále vysoká hlavně proto, že většina ovariálních nádorů (75–80 %) se diagnostikuje v pokročilých stádiích ( FIGO III a IV)(2). Dle NOR byla mortalita v roce 2011 – 13,1/100000 žen(1).

### Časový vývoj hrubé mortality

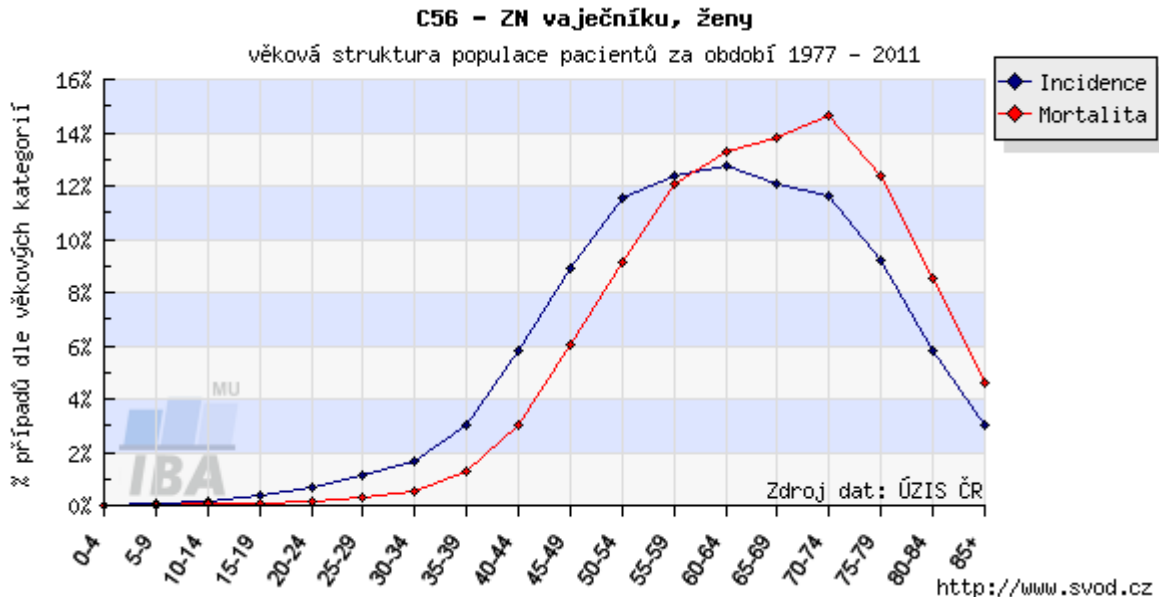


### Zastoupení klinických stádií v čase



Ovariální nádory jsou z gynekologických nádorů nejčastější příčinou smrti – 47 %. Průměrný věk se značně liší v obou skupinách ovariálních zhoubných nádorů, ve skupině epitelálních zhoubných nádorů je průměrný věk v době diagnózy 57 let, u neepitelálních cca 33 let(3).

*Věková struktura pacientek s epitelálními malignitami vaječníku*

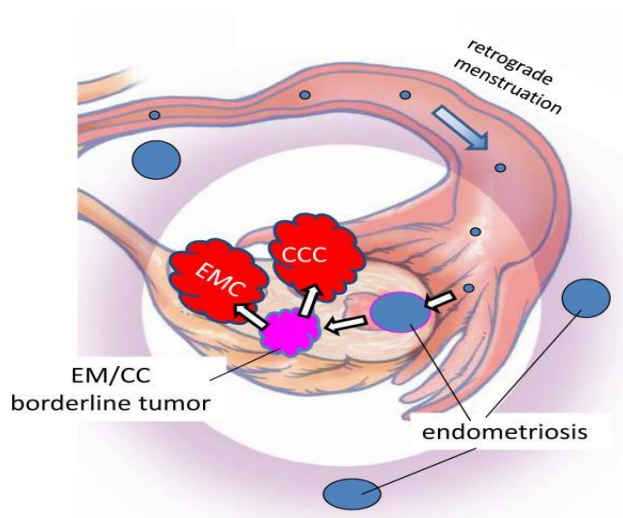


Incidence narůstá s věkem, riziko pro ženu 70 letou je 4 x větší než pro ženu 40 letou.

## Etiopatogeneze ovariálního karcinomu (4)

V posledních pěti až šesti letech se událo na poli pochopení patogeneze epiteliálního ovariálního karcinomu mnohé. Původní a stále „částečně“ platné etiopatogenetické teze – hypotéza nepřetržitých ovulací, hypotéza gonadotropinová, jsou v současnosti nahrazeny jakýmsi dualistickým modelem tumorogeneze. Nový směr ukazují klinicko-patologické a molekulárně genetické studie, které přinášejí tento dualistický model tumorogeneze a dělí tak ovariální epiteliální malignity na **Typ I** a **Typ II**.

Malignity řadící se pod typ I mají poměrně dobře identifikované prekuzory a jejich progresse jde po krocích od benigního, zpravidla cystického tumoru přes borderline tumory k invazivnímu karcinomu. V době projevení bývají spíše omezené na vaječníky, chovají se jako „pomalé“ nádory, jsou charakterizovány vyšším pětiletým přežitím ve srovnání s typem II a sdílejí společně mnohé molekulárně genetické alterace, které nelze najít u typu II. Jsou poměrně geneticky stabilní a vznikají obvykle kumulací somatických mutací v genech KRAS, BRAF a ERBB2, či PTEN, PIK3CA a CTNNB1 (kódování genu beta catenin), ale jen velmi zřídka p53. Inaktivace BRCA nebyla u typu I nalezena. Zahrnují low-grade serozní a low-grade endometroidní karcinomy, clear-cell a mucinozní karcinomy a maligní Brennerův tumor. Původ serozních tumorů je pravděpodobně v oblasti fimbrií vejcovodů. Když tyto primárně neovariální buňky dosáhnou povrchu vaječníku, dojde ke vzniku inkluzní cysty, mutacemi ve výše zmíněných genech dochází postupnými kroky k maligní transformaci a ke vzniku low-grade serozního tumoru. Endometroidní a clear cell nádory vznikají v endometriální tkáni, která se dostává do oblasti pánve mechanismem retrográdní menstruace a dává základ endometrióze. Mucinozní a Brennerův tumor vznikají z přechodného epitelu z oblasti tubomesoteliální junkce, kde fimbrie vejcovodu přichází do kontaktu s peritoneem.

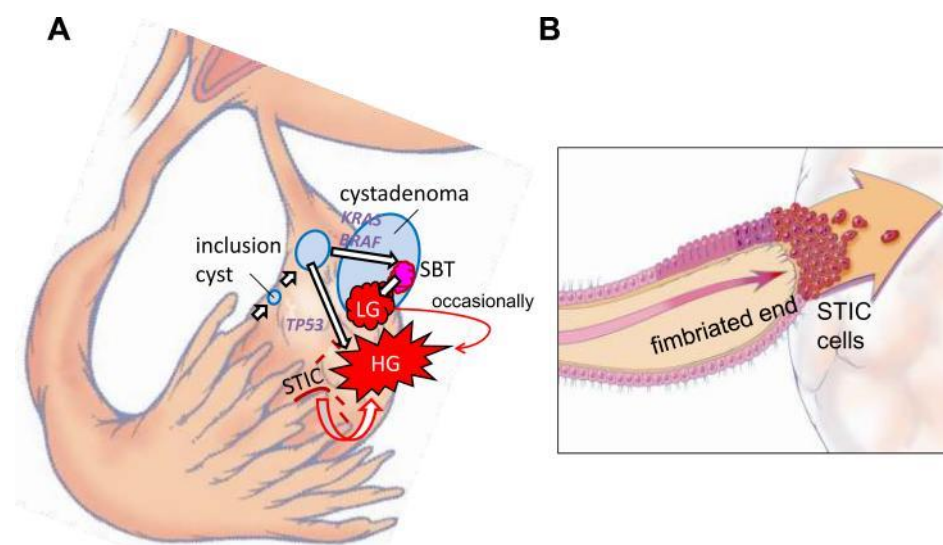


*Převzato z: The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer – Kurman, Shih - Am J Surg Pathol – Mar 2010*



Nádory řadící se pod typ II bývají, oproti nádorům typu I, zachyceny v pokročilých stádiích, vznikají *de novo*, chovají se agresivně, typická je pro ně mutace genu p53 (ve více než 80 % případů) a jsou velice geneticky nestabilní. Jsou charakterizovány horší prognózou a vyšším gradingem. Inaktivace BRCA, mutací či metylací promotoru, se nachází u 40-50% high-grade serozních karcinomů. Hlavními tumory typu II jsou high-grade serozní karcinom, karcinosarkom a nediferencovaný karcinom.

High-grade serozní karcinom představuje téměř 75% všech epiteliálních ovariálních karcinomů a sám se podílí cca 90% na mortalitě pro ovariální karcinom. Hledání etiopatogenetické cesty vzniku tohoto závažného tumoru je proto náplní řady výzkumů posledních desetiletí. Dosud se předpokládalo, že nádor vzniká maligní transformací povrchového epitelu vaječníku. Nový pohled spatřuje původ ve vejcovodu, konkrétně v lézi nazývané STIC – serous tubal intraepithelial carcinoma, kterou se prezentuje zhruba 70% případů a kterou je možné při pečlivém histologickém zpracování sekčního materiálu nalézt vedle invazivního karcinomu. Prakticky všechny tyto léze vykazují stejnou p53 pozitivitu jako high-grade serozní karcinom. Buňky této léze po exfoliaci dosáhnou povrchu vaječníku, implantují se a dají vznik high-grade seroznímu karcinomu. Druhou možností vzniku tohoto závažného nádoru je již výše zmíněný mechanismus vzniku inkluzní cysty a mutace v genu p53 .



*Převzato z: The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer – Kurman, Shih - Am J Surg Pathol – Mar 2010*

Koncept, že velká část ovariálních karcinomů má původ mimo vaječník, je velkým odklonem od původního smýšlení a otvírá možnosti pro nové postupy včasné detekce, léčby a možné prevence tohoto závažného a devastujícího onemocnění.

Dosud neexistuje funkční screening ovariálního karcinomu. Cílem je najít takový test či kombinaci metod, které zachytí onemocnění v časném stádiu, nejlépe stále omezené na vaječníky, a je tedy vysoká šance na jeho vyléčení a redukci mortality. Dosud používané modalit – gy-

nekologické vyšetření, transvaginální ultrazvukové vyšetření a sérové biomarkery CA125 a HE4 – zatím nepřinesly tyto očekávané výsledky. Vzhledem k výše uvedenému dualistickému modelu, který ukazuje na heterogenitu ovariálního karcinomu, je zřejmé, že jeden screeningový test nebude dostačující.

Dalším nezbytným krokem je individualizace léčby. Výše zmíněné charakteristiky nádorů typu I a II ukazují, že jednotný přístup též není optimální.

Pro nádory typu I zastižené omezené na vaječník by mohla být dostačující salpingo-oophorektomie. V případě jejich šíření je nutná systémová léčba, ovšem vzhledem k pomalé proliferaci není chemoterapie efektivní. Jako možnost se jeví cílená genová terapie např.: BRAF inhibitory, MAPK kinázové inhibitory.

Nádory typu II vyžadují zcela jiný přístup. Léčba by měla být započata již při zjištění pozitivníty markerů, které by měly vykazovat dostatečnou senzitivitu a specificitu pro časná stádia, tedy dříve, než dojde k manifestaci orgánových změn na podkladě pokročilé malignity. Pouze tento přístup dává největší naději na úspěšné vyléčení.

Příkladem preventivního postupu je profylaktická oboustranná adnexektomie u BRCA pozitivních žen. Okultní karcinom byl nalezen při histologickém vyšetření těchto tkání ve 4-17% případů a 57-100% jich bylo lokalizováno v distální části vejcovodů a fimbríích. Celosvětově diskutovaným tématem je možnost redukce rizika nejčastějšího histotypu ovariálního karcinomu spojeného i s BRCA pozitivitou, high-grade serozního karcinomu, provedením samotné bilaterální salpingektomie v první době a následné doplnění oboustranné ovaiektomie s odstupem, na místo v současnosti prováděné profylaktické adnexektomie. Tímto přístupem by bylo možné redukovat rizika hormonální deplece plynoucí z tohoto výkonu u premenopauzální populace žen. Jedná se zejména o kardiovaskulární morbiditu a mortalitu, osteoporozu se svými důsledky, plicní karcinom atd. Otázkou dále je, ve kterém roce života přistoupit k tomuto výkonu. V současnosti se akceptuje věkové rozmezí 35-40 let a po ukončení reprodukčních plánů ženy. Do té doby by měla být riziková žena zařazená do pravidelného sledování pomocí ultrazvuku a nádorových markerů v intervalech kratších než 1 rok.

Další otázkou je, zda přistoupit k systémové léčbě u pacientek s nálezem STIC, zejména pokud je pozitivní lavage, což indikuje již probíhající exfoliaci buněk z této přednádorové léze se všemi možnými důsledky.

## **Rizikové a protektivní faktory karcinomu vaječníku**

Mezi rizikové faktory sporadických karcinomů patří (3):

- nuliparita – RR 1,27 – 2,45

- časná menarche – kontroverzní RF
- věk – riziko CA ovaria stoupá s věkem
- sterilita – RR 2,7
- užívání HRT (hormonální substituční terapie) – ERT má RR 2 při užívání 10 a více let
- endometrióza – zvýšené riziko clear cell a endometroidního CA
- dietní návyky
- obezita

Za familiárními karcinomy stojí zejména tři hlavní hereditární syndromy:

- hereditární karcinom prsu a ovaria s mutací BRCA1 /riziko CA ovaria 40-60%/ a BRCA2 /riziko CA ovaria 23%/
- site-specific syndrom karcinomu ovaria
- Lynchův syndrom /riziko CA ovaria 4-12%/

Protektivní faktory jsou:

- multiparita – každý porod snižuje riziko o 10-15 %
- celková doba kojení (blokuje se ovulace)
- hormonální antikoncepce – RR je po 5 letech 0,5 a trvá 15-20 let
- sterilizace
- hysterektomie (3)

## **Histologická klasifikace**

Histologicky jsou ovariální malignity velmi heterogenní skupinou. Můžeme sem zařadit

- nádory z povrchového epitelu a stromatu (karcinomy a borderline nádory) tvořící 80-90% ovariálních malignit
- nádory ze specializovaného mezodermu gonád = gonadostromální nádory (z granulózových buněk, Sertoliho buněk, stromálních buněk a steroidogenních buněk)
- nádory ze zárodečných buněk (z germinálních buněk, teratomy)
- nádory ostatní
- nádory sekundární – metastatické (žaludek, kolorektální oblast, apendix, prs)(3)

Většina ovariálních malignit má sporadický výskyt. Asi 5-10 % nádorů je familiárních.

## **Klinický obraz a diagnostické metody (3)**

Časná stádia ovariálního karcinomu jsou na symptomatologii chudá. Často je ovariální malignita diagnostikována náhodou při operačním výkonu z jiné indikace. 75-80% nádorů vaječníku je diagnostikováno v pokročilých stádiích FIGO III a IV.

Pacientky si stěžují na:

- pocit plnosti
- nadýmání
- nechutenství
- zvětšování objemu břicha
- poruchy vyprazdňování stolice, event. obtíže při močení
- někdy může být prvním projevem onemocnění otok dolních končetin či trombóza

Pro diagnostiku je obligatorní:

- komplexní gynekologické vyšetření
- RTG vyšetření hrudníku
- sonografické vyšetření vaginální a abdominální sondou, ideálně expertní – při kombinaci sonomorfologických a dopplerovských kritérií dosahuje sonografie senzitivity 96% a specifity 90% při diferenciaci mezi benigním a maligním ovariálním postižením

Tyto postupy se obligatorně kombinují s **laboratorním stanovením sérových nádorových markerů**.

V rámci diferenciální diagnostiky byly testovány různé markery a jejich kombinace v různých panelech. Udávaných kombinací s dobrými výsledky je mnoho. Např. v práci kolektivu Yurkovetsky et al. uveřejněné v roce 2011 v Journal of Clinical Oncology, bylo cílem najít nejlepší kombinaci markerů pro včasnou detekci ovariálního karcinomu. Testováno bylo 96 sérových proteinů. Jako nejlepší se ukázala kombinace CA125 + HE4 + CEA + VCAM-1 /vascular cell adhesion molecule 1/. Tato kombinace dokázala odlišit ovariální karcinom od kolorektálního ve 100%, od karcinomu prsu v 94% a karcinomu plic v 64%. Závěrem je, že tato kombinace by mohla být primárním krokem ve dvoustupňovém procesu časně detekce ovar. karcinomu a sloužit jako třídící test k selekci pacientek pro následné vyšetření transvaginálním ultrazvukem(5). Další práce zabývající se tímto problémem přinesla jako ideální kombinaci TU markerů CA125 + HE4 + CEA + CYFRA 21-1(6). Jiné multiplexové analýzy kombinují např: CA 125 + CA72-4 + CEA + TPA.

Definitivní diagnóza je stanovena z histologického vyšetření tkáně získané v rámci primární operace či z minimálně invazivních postupů – laparoskopie, true-cut biopsie, FNAB /fine needle aspiration biopsy/, či na základě cytologického vyšetření vzorku ascitu či fluidothoraxu.

V případě nedostatečných informací z těchto vyšetření je pro klinický staging nutné někdy doplnit některé z fakultativních vyšetření:

- CT – má svůj význam ve stagingu pokročilých ovariálních karcinomů – přesnost 77%
- NMR – uplatňuje se v diferenciální diagnostice benigních a maligních nádorů – senzitivita 83% a specificita 84%
- PET/CT – užívá se diagnostice recidivy a rozsahu nádorového postižení – senzitivita 90% a specificita 86%
- IVU – vylučovací urografii
- cystoskopii
- rekto-/kolonoskopii

## Staging – FIGO 2014

2014 FIGO ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancer staging system and corresponding TNM.

| I         | Tumor confined to ovaries or fallopian tube(s)   | T1            |
|-----------|--|---------------|
| IA        | Tumor limited to one ovary (capsule intact) or fallopian tube, No tumor on ovarian or fallopian tube surface No malignant cells in the ascites or peritoneal washings  | T1a           |
| IB        | Tumor limited to both ovaries (capsules intact) or fallopian tubes<br>No tumor on ovarian or fallopian tube surface<br>No malignant cells in the ascites or peritoneal washings  | T1b           |
| IC        | Tumor limited to one or both ovaries or fallopian tubes, with any of the following:<br>IC1 Surgical spill intraoperatively<br>IC2 Capsule ruptured before surgery or tumor on ovarian or fallopian tube surface<br>IC3 Malignant cells present in the ascites or peritoneal washings | T1c           |
| II        | Tumor involves one or both ovaries or fallopian tubes with pelvic extension (below pelvic brim) or peritoneal cancer (Tp)  | T2            |
| IIA       | Extension and/or implants on the uterus and/or fallopian tubes and/or ovaries  | T2a           |
| IIB       | Extension to other pelvic intraperitoneal tissues  | T2b           |
| III       | Tumor involves one or both ovaries, or fallopian tubes, or primary peritoneal cancer, with cytologically or histologically confirmed spread to the peritoneum outside the pelvis and/or metastasis to the retroperitoneal lymph nodes  | T3            |
| IIIA      | Metastasis to the retroperitoneal lymph nodes with or without microscopic peritoneal involvement beyond the pelvis   | T1,T2,T3aN1   |
| IIIA1     | Positive retroperitoneal lymph nodes only (cytologically or histologically proven)   |               |
| IIIA1(i)  | Metastasis ≤ 10 mm in greatest dimension (note this is tumor dimension and not lymph node dimension)   | T3a/T3aN1     |
| IIIA1(ii) | Metastasis > 10 mm in greatest dimension   |               |
| IIIA 2    | Microscopic extrapelvic (above the pelvic brim) peritoneal involvement with or without positive retroperitoneal lymph nodes  | T3a/T3aN1     |
| IIIB      | Macroscopic peritoneal metastases beyond the pelvic brim ≤ 2 cm in greatest dimension, with or without metastasis to the retroperitoneal lymph nodes   | T3b/T3bN1     |
| IIIC      | Macroscopic peritoneal metastases beyond the pelvic brim > 2 cm in greatest dimension, with or without metastases to the retroperitoneal nodes (Note 1)  | T3c/T3cN1     |
| IV        | Distant metastasis excluding peritoneal metastases   |               |
|           | Stage IV A: Pleural effusion with positive cytology  | Any T, Any N, |
|           | Stage IV B: Metastases to extra-abdominal organs (including inguinal lymph nodes and lymph nodes outside of abdominal cavity) (Note 2)   | M1            |
|           | (Note 1: includes extension of tumor to capsule of liver and spleen without parenchymal involvement of either organ)   | T3c/T3cN1     |
|           | (Note 2: Parenchymal metastases are Stage IV B)  |               |

Notes:

1. Includes extension of tumor to capsule of liver and spleen without parenchymal involvement of either organ.
2. Parenchymal metastases are Stage IV B.

## Nádorové markery

Produkce nádorových markerů patří mezi základní charakteristiky přítomnosti maligních nádorů. Mezi nádorové markery řadíme některé antigeny, enzymy, hormony, hormonální receptory a s nádorem sdružené proteiny. Tyto látky odrážejí proliferační aktivitu dané tkáně, buněčnou diferenciaci či buněčnou destrukci. Jedno z možných dělení nádorových markerů je na celulární a humorální, tedy takové, které se buď nacházejí v maligní tkáni či v tělesných

tekutinách, nebo markery nádorem indukované nebo s nádorem asociované, tedy takové, které maligní tkáň sama produkuje nebo k jejich produkci stimuluje tkáň tělu vlastní – schéma možného dělení markerů ukazuje graf na konci této stati(7).

Ke zjištění jejich přítomnosti se vyšetřuje nejčastěji vzorek séra, dále moči či dalších tělesných tekutin a je možné je detekovat ve vlastním tumoru či jiných tkáních, jak je zmíněno výše. K detekci se nejčastěji užívají metody RIA, IRMA a ELISA s využitím komerčních kitů a automatických analyzátorů. Aby bylo dosaženo jednotného posuzování markerů u jednotlivých malignit a pro zajištění standardizace vyšetřovacích metod, byla ustanovena mezinárodní komise EGTM /European Group of Tumour Markers/ v roce 1997.

Markery samotné a jejich elevace však jen zřídka ukazují na přítomnost malignity. Většina markerů je také tvořena normálními buňkami a dochází k jejich elevaci i při řadě fyziologických situací. Naproti tomu stojí fakt, že některé malignity se vyskytují bez zvýšených hladin markerů.

Přes tato fakta jsou nádorové markery součástí naší denní rutiny. Obecně jsou využívány ve screeningu a časně detekci některých malignit, v diferenciálně diagnostickém algoritmu u pacientek s podezřením na malignitu, k určení prognózy onemocnění jako jeden z pomocných faktorů, při sledování účinnosti léčby a pátrání po recidivě onemocnění.

Bohužel, dosud nebyl objeven marker, který by se přibližoval „ideálnímu markeru“ tj.:

- produkovaly by jej pouze buňky maligního nádoru
- rychle by přecházel do tělesných tekutin, kde by dosahoval vysokých koncentrací již při malé velikosti nádoru
- hodnoty by korelovaly s objemem nádoru
- neexistovala by závislost na glomerulární filtraci atd.

Takový marker by měl mít téměř 100 % senzitivitu, specificitu a pozitivní prediktivní hodnotu.

Důležitou charakteristikou markeru je jeho biologický poločas degradace. Na tomto faktu závisí vlastnost markerů rychle reflektovat změny nádorové hmoty. Ty markery, jejichž biologický poločas je krátký, reflektují změny velikosti tumorů rychleji, než ty markery s dlouhým biologickým poločasem. Paradoxní situací je pak elevace markerů po započetí onkologické léčby, kdy dojde k nekróze určitého procenta nádorové hmoty doprovázené

uvolněním toho kterého markeru do oběhu pacientky. Tato situace tedy nemusí být signálem neúspěchu podávané kombinace chemoterapie, ale naopak(3).

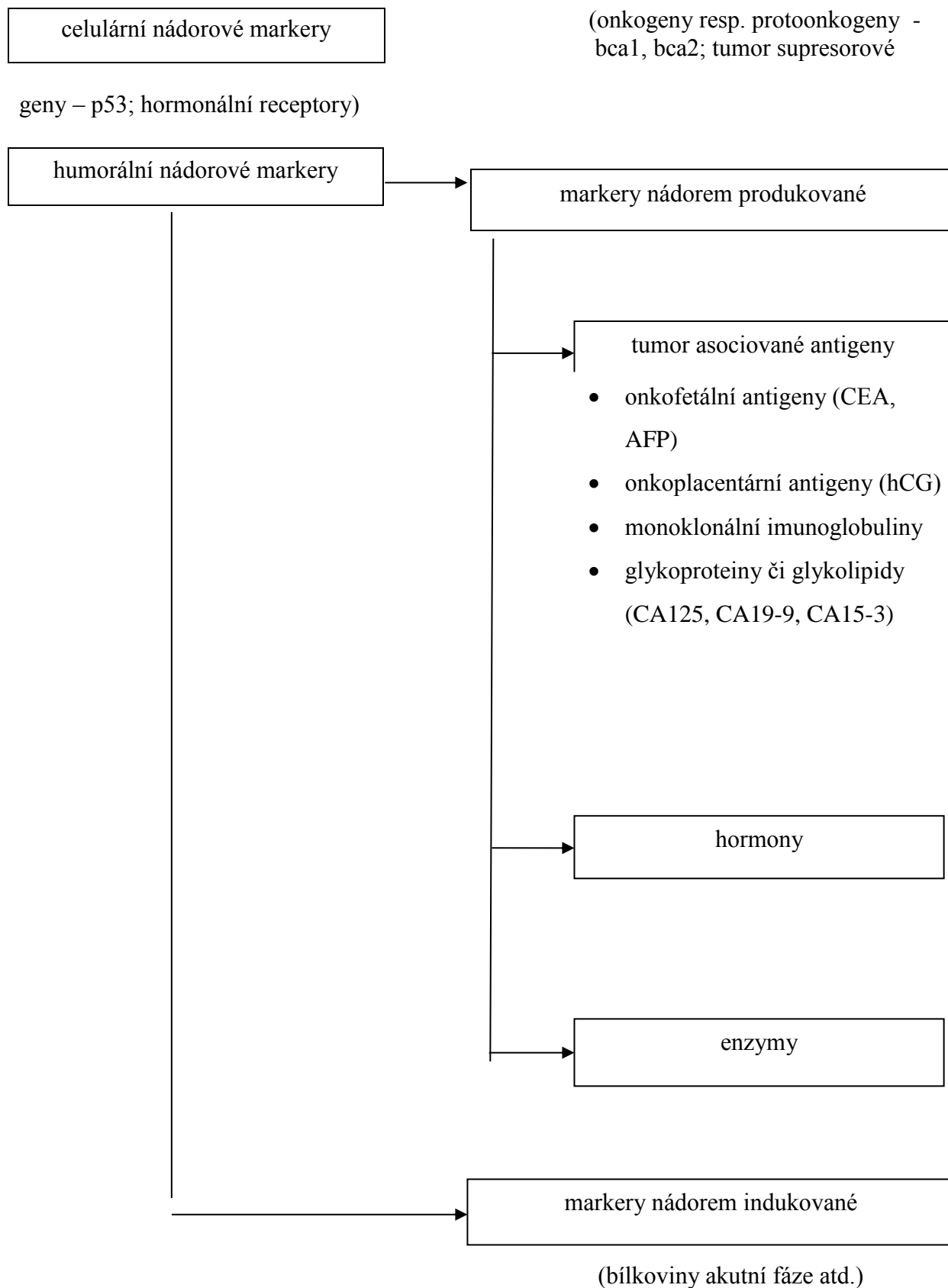
*Biologický poločas vybraných markerů (převzato z Cibula D, Petruželka L: Onkogynekologie. Praha, Grada Publishing, a.s., 2009)*

| <b>Marker</b>  | <b>Biologický poločas v hodinách</b> |
|----------------|--------------------------------------|
| <b>CA 125</b>  | <b>96 /4 dny/</b>                    |
| <b>CA 19-9</b> | <b>120 /5 dní/</b>                   |
| <b>CEA</b>     | <b>340 /14 dní/</b>                  |
| <b>TPS</b>     | <b>170 /7 dní/</b>                   |

Dalším důležitým faktem je možná heterogenita nádorů, která sebou nese nutnost stanovení několika markerů k postihnutí přítomnosti a biologického chování možných více typů tkání v nádoru obsažených.

..

Schéma možného dělení markerů – převzato z Racek J et al.: *Klinická biochemie. Praha, Galén, 1999*





## **Charakteristiky vybraných nádorových markerů využívaných v rámci vyšetřování pacientek s malignitou ovarií**

### **Antigen CA125**

Antigen CA125, první sérový nádorový marker testovaný pro ovariální karcinom, byl představen v roce 1983 kolektivem kolem profesora Roberta C. Basta z MD Anderson, USA(8). Jedná se o glykoprotein o molekulové hmotnosti 500 kD. Ve fetálním období zjišťujeme jeho přítomnost v povrchovém epitelu orgánů coelomového původu. Zvýšené hodnoty je možné naměřit i za fyziologických stavů: menstruace, gravidita. Dále u benigních nádorů ovarií, u endometriózy, adnexitidy, myomů a při jakémkoliv dráždění serózních blan bez ohledu na etiologii procesu. Hodnoty se zvyšují na jedné straně u benigních onemocnění jako je kardiální, jaterní selhání selhání, virové a bakteriální záněty na druhé straně u maligních procesů včetně primárních a sekundárních nádorů peritonea, pleury a perikardu (9). Z malignit zvyšuje jeho hladiny zejména serózní cystadenokarcinom ovaria a další histotypy, karcinom endometria a endocervixu. Zvýšené hladiny je možné zaznamenat u nádorů prsu, plic, GIT. Z výše uvedeného je zřejmá nízká specifita tohoto antigenu.

Dle NACB (National Academy of Clinical Biochemistry) a EGTM (European Group of Tumour Markers) bylo stanoveno několik doporučení týkajících se vyšetřování a využití CA 125, která postupně v následujícím textu budou zmíněna.

Dop. 1/ se týká odběru krve na stanovení CA 125 – v ideálním případě by měla být analýza prováděna krátce po rychlé centrifugaci vzorku a separaci séra od sedimentu, a vzorek by měl být skladován buď při 4st.C. (1-5 dní) či při -20st.C. (2 týdny-3 měsíce) v krátkodobém režimu vyšetřování či při -70st.C. při dlouhodobém režimu skladování/vyšetřování(10).

Velká snaha je trvale věnována využití stanovení CA 125 spolu s dalšími vyšetřovacími modalitami při hledání optimálního screeningového programu karcinomu vaječníku.

Dop. 2/ se týká využití markeru CA 125 ve screeningu – vyšetření markeru CA 125 není doporučeno pro screening asymptomatických žen. Spolu s ultrazvukovým vyšetřením je však možné využít marker CA 125 pro včasnou detekci ovariálních malignit u selektované skupiny žen s hereditárními syndromy (10).

Stanovení hodnoty markeru CA 125 hraje svoji zásadnější roli, v porovnání s hledáním

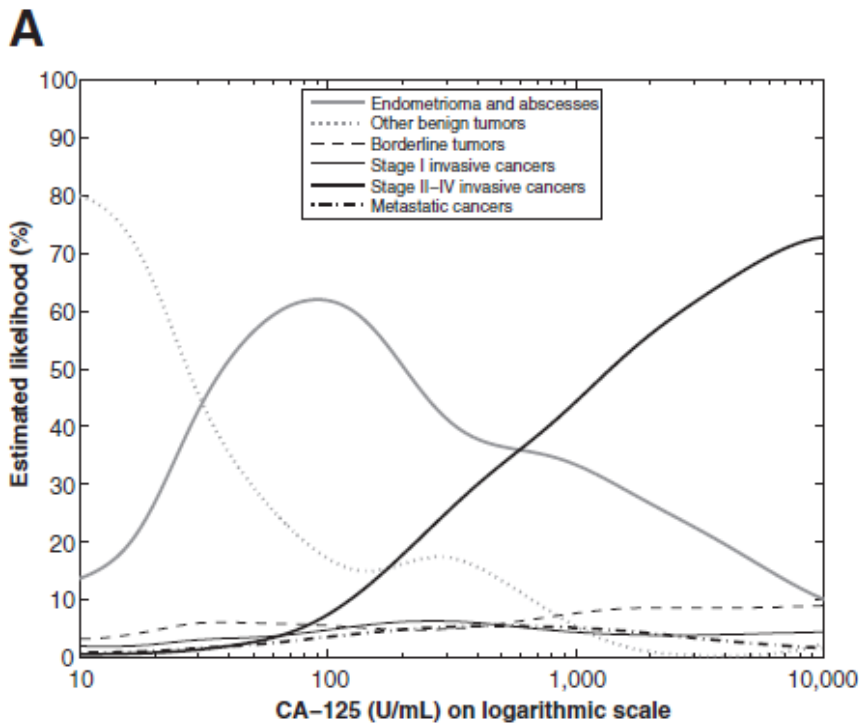
optimálního screeningového programu, v diferenciální diagnostice tumorů malé pánve. Více než 80 % pacientek s karcinomem ovaria má zvýšené hodnoty CA 125 s tím, že elevace doprovází kolem 50-60% případů stadia I, 80-90% pacientek má elevaci CA125 ve stadiu II a více než 90% v pokročilých stádiích III a IV(11). Negativní hodnoty tedy nevylučují přítomnost maligního onemocnění (12).

CA 125 je nedílnou součástí RMI (risk of malignancy index), který je vodítkem pro další management pacientek s adnexální či pánevní rezistencí. RMI je výsledkem koncentrace CA 125 násobené menopauzálním stavem (1x u premenopauzálních žen, 3x u postmenopauzálních žen) a dále násobené ultrazvukovým skóre (0, 1, 3 dle sono znaků). Při překročení cut-off pro RMI (</> 200 či 250) je pacientka referována na onkogynekologické pracoviště k další léčbě. Senzitivita RMI se udává 71-78% a specificita 75-94%.

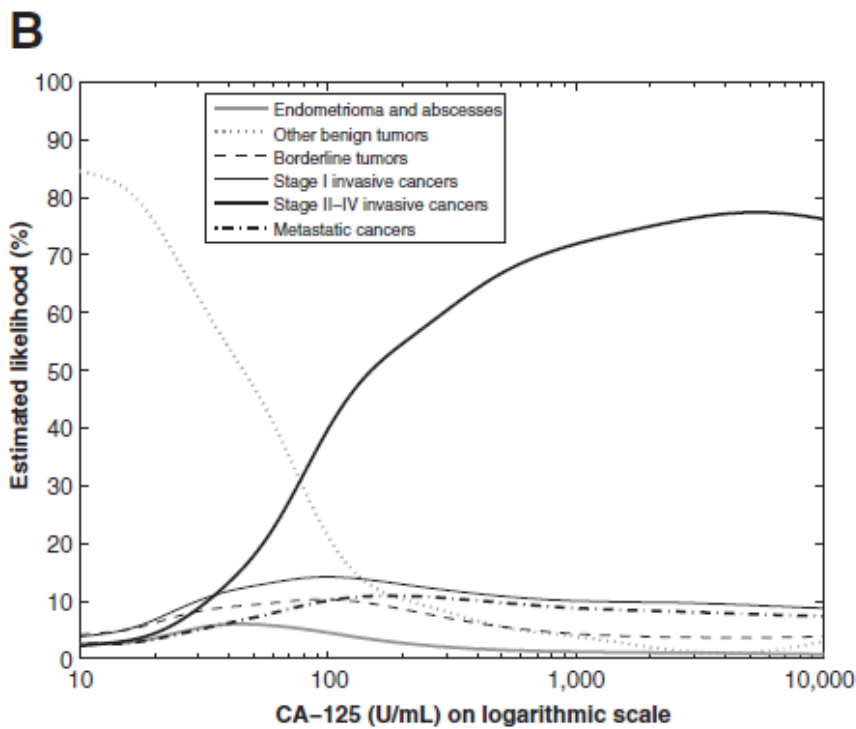
Dop. 3/ vyšetření markeru CA 125 je doporučeno jako doplňkové vyšetření při rozhodování o benigní či maligní povaze pánevního nálezu zejména u postmenopauzálních žen.

V roce 2011 byla publikována zajímavá práce skupiny IOTA (International Ovarian Tumor Analysis) stanovující pravděpodobnost přítomnosti určitého ovariálního nádorového postižení u premenopauzálních a postmenopauzálních žen na základě hodnot CA 125, nikoli tedy pouze na základě pozitivního či negativního výsledku testu (13).

Převzato z: Van Calster B, Valentin L, Van Holsbeke C, et al: A novel approach to predict the likelihood of specific ovarian tumor pathology based on serum CA-125: a multicenter observational study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20:2420-8, 2011



A – premenopauzální ženy



B – postmenopauzální ženy

Kromě diagnostiky se využívá stanovení CA 125 zejména v rámci sledování odpovědi na léčbu, chirurgickou či onkologickou a ve follow-up onkologických pacientek s diagnózou karcinomu vaječníku. Hodnoty CA125, kterých je dosaženo po léčbě a jsou v referenčních mezích, jsou normální hodnoty pro tu kterou pacientku. Pokud dojde k vzestupu této hodnoty o 50 %, byť v rámci normy, signalizuje tento vzestup počínající recidivu. Vzestup sérového markeru CA125 předchází klinickým projevům nemoci a detekci zobrazovací metodou o 3-4 měsíce. Bohužel, včas zahájená léčba reagující na tento vzestup neprokázala prodloužení přežití.

Evropská společnost gynekologické onkologie – ESGO /European Society of Gynaecological Oncology/ přijala v roce 2011 usnesení k roli stanovení CA 125 u pacientek ve follow-up ovariálního karcinomu (14, 15). Tento statement je uveden na konci této práce.

Marker CA125 je jedním z panelu markerů, který FDA (Food and Drug Administration) schválila jako doplňkové vyšetření ke gynekologickému vyšetření a fyzikálnímu vyšetření v triage pacientek pro jejich odeslání na vyšší pracoviště, tj. do onkogynekologického centra. Jedná se o panel OVA1 (Transthyretin nebo prealbumin, Apolipoprotein A-1, beta-2-mikroglobulin, transferin, CA 125). Vždy je nutná též kombinace se zobrazovacím vyšetřením.

U pacientek s endometriálním karcinomem se udává, že pouze 10 až 20% pacientek v časném stadiu a 25% asymptomatických pacientek s rekurentním onemocněním má zvýšenou hodnotu markeru CA 125(16). Více o této problematice pojednává stať o endometriálním karcinomu.

## **HE4, human epididymis protein 4 = lidský epididymální protein 4**

HE4 /lidský epididymální protein 4/ známý jako WFDC2 /Whey acidic four-disulfide core 2/ byl poprvé klonován jako jeden ze čtyř cDNA vysoce exprimovaných v lidské epididymis v roce 1991(17), protilátky proti proteinu HE4 poprvé byly připravené v roce 2003(18).

Je produktem jednoho ze 14 homologních genů na chromosomu 20q12-13.1 kódujících proteiny s whey-acidic-protein /WAP/ - type four disulphide core /WFDC/ doménou. HE4 cDNA kóduje protein částečně homologický s extracelulárními proteinovými inhibitory(17). Fyziologická role HE4 se zatím určuje, přesto je však zřejmé, že geny v WFDC lokusu

pravděpodobně hrají jistou roli v přirozené imunitě a podílejí se na antimikrobiální a protizánětlivé aktivitě(19, 20). O možné roli HE4 v kancerogenezi je známo málo.

Genová exprese HE4 byla zjištěna v některých plicních, endometriálních, prsních a ovariálních adenokarcinomech. Méně často pak v karcinomech gastrointestinálního traktu a urologických nádorech.

Řada studií poukázala na upregulaci exprese HE4 genu v epiteliálních ovariálních karcinomech, a to sehrálo velkou roli ve stanovení HE4 jako biomarkeru ovariálního karcinomu. Exprese HE4 dle histologického typu ovariálního karcinomu se uvádí následovně (21):

- serózní ovariální karcinom 93%
- endometrioidní ovariální karcinom 100%
- světlobuněčný ovariální karcinom 50%
- mucinózní ovariální karcinom 0% (HE4 vůbec neprodukuje)

Vzhledem k výše zmíněným skutečnostem u markeru CA 125 je zřejmá jeho nízká specifická a to zejména u premenopauzálních žen. V řadě studií se zkouší jiné markery, samotné či jejich kombinace, avšak v rámci diagnostiky ovariálního karcinomu se jako nejlepší jeví právě lidský epididymální protein 4 – HE4. Vykazuje nejvyšší senzitivitu jako single biomarker pro ovariální karcinom /73%/, pokud je však využit v kombinaci právě s CA 125 je senzitivita 76%. Ostatní zkoušené biomarkery jako CA 72-4, activin, inhibin, osteopontin, EGF, jen minimálně zvyšují senzitivitu CA 125(22).

Kolem 20% epiteliálních ovariálních karcinomů vykazuje malou, pokud nějakou, expresi CA125, a tudíž samotný marker CA125 může být nedostatečný. U více než 50% těchto malignit můžeme pozorovat zvýšené hladiny HE4, a proto kombinace markerů může tyto pacientky, resp. ovariální malignity u těchto pacientek zachytit (22). Obecně lze říci, že specifická markeru HE4 je v porovnání s CA 125 vyšší. Jedním z mála stavů, který zvyšuje hladinu HE4 a není stavem nádorovým, je renální insuficience. V tomto případě dochází k elevaci HE4 prakticky ve 100% případů.

Dosavadní práce přinášejí slibné výsledky i v rámci follow-up, sledování odpovědi na léčbu a monitorování rekurence onemocnění (23).

**ROMA, risk of ovarian malignancy algorithm**, byl vyvinut k odhadu rizika epiteliálního ovariálního karcinomu. Tento algoritmus počítá s hodnotami CA125 a HE4 a bere v úvahu menopauzální statut pacientky. Ultrazvukový nález v hodnocení není zohledněn. Výsledkem je číselně vyjádřená pravděpodobnost nálezů ovariálního karcinomu při chirurgickém výkonu. ROMA index pacientky stratifikuje do 2 skupin: low risk x high risk, tedy takové, u kterých je pravděpodobnost nálezů malignity v průběhu operačního výkonu nízká či vysoká. Slouží tak k triage pacientek. Při 75% specifitě jsou hodnoty ROMA pro premenopauzální ženy - 7,4%, pro postmenopauzální ženy - 25,3%. PPH 58%, NPH 97%(24).

## ROMA index

$$ROMA (\%) = \frac{e^{PI}}{1 + e^{PI}} \times 100$$

*PI (po menop)*

$$= -8,09 + 1,04 \times \ln HE4 + 0,732 \times \ln CA125$$

*PI (před menop)*

$$= -12,0 + 2,38 \times \ln HE4 + 0,0626 \times \ln CA125$$

## CA 19-9

Tento marker je monoklonální protilátkou definovaný mucin-sialo-glykolipid s molekulovou hmotností 36 kDa. Epitop představuje sialylovaný pentasacharid lakto-N-fukopentaózy II, t.j. haptén determinanty lidské krevní skupiny typu Lewis (a). Výskyt CA 19-9 úzce souvisí s Lewis(a) determinantou krevní skupiny. U vzácně se vyskytující Lewis(a-/b-) skupiny není tento nádorový marker produkován. U plodu se vyskytuje v epitelových buňkách, především trávicího ústrojí, pankreatu a jater. U dospělých je produkován jen ve velice omezené míře epiteliálními buňkami bronchů a trávicího ústrojí. V minimálních koncentracích se vyskytuje v krvi, pleurálním výpotku, ascitu a mozkomíšním moku. CA19-9 se eliminuje výhradně žlučí. Fyziologická funkce není známa. Využívá se pro diagnostiku a k monitorování léčby Ca

pankreatu, Ca žlučníku a žlučových cest, Ca jater, kolorektálního Ca (v kombinaci s CEA). Zvýšené hladiny se mohou vyskytnout u dalších maligních onemocnění, a to u Ca žaludku, Ca prsu, Ca ovarií (především mucinózního typu), Ca dělohy a při metastázách výše uvedených karcinomů do jater. V málo diferencovaných karcinomech se jeho produkce snižuje a v anaplastických úplně chybí. Zvýšené hodnoty lze nalézt i při benigní etiologii onemocnění - cirhóza jater, primární biliární cirhóza, akutní hepatitida toxická hepatitida, chronická hepatitida, cholecystitida, cholangitida, choledocholitíza, benigní onemocnění žaludku a střeva (především zánětlivá), akutní a chronická pankreatitida(3).

## **CEA**

CEA (Karcinoembryonální antigen) je glykoprotein s molekulovou hmotností 180 kDA, který je z 55% tvořen sacharidy a ze 45% bílkovinami. Vysoká heterogenita molekuly je dána heterogenitou sacharidové složky, proteinová složka je konstantní. CEA je onkofetální bílkovina, kterou lze prokázat v epitelových buňkách hlavně trávicího ústrojí a bronchů. V minimálních koncentracích se vyskytuje v krvi, pleurálního výpotku, ascitu, likvoru. Nejvyšší koncentrace jsou ve slinných žlázách a jejich vývodech. CEA je metabolizován v játrech. U plodu není jasná a u dospělých se předpokládá funkce adhezivní molekuly především v játrech základní význam má stanovení CEA u nádorů tlustého střeva, nádorů prsu a nádorů plic. Zvýšené hladiny lze nalézt u dalších maligních nádorových onemocnění.: Ca žaludku, Ca vaječnicků, Ca dělohy a Ca prostaty. Zvýšené hodnoty nacházíme i při benigní etiologii onemocnění.: u kuřáků, po provedeném vyšetření per rektum, při chronickém renálním selhání, u chronického onemocnění jater, chronické hepatitidy, chronické pankreatitidy, ulcerózní kolitidy, m.Crohn, bronchopneumonie, chronické bronchitidy, TBC, mukoviscidózy, autoimunitních chorob, v tekutině cyst prsu a vaječnicků, v kloubní tekutině u chronické revmatoidní artritidy atd(3).

## **Thymidinkináza (TK)**

TK je enzym katalyzující přímou fosforylaci thymidinu na thymidinmonofosfát(TMP). TMP je převeden v několika krocích na trifosfát, který je zabudován do DNA. TK hraje podstatnou roli při zpracování thymidinu v buňce. Jako substrát používá TK buď exogenní thymidin z potravy nebo endogenní uvolněný z odbourávacích reakcí. *De novo* probíhá syntéza TMP za katalýzy TK z deoxyuridinmonofosfátu za přítomnosti kyseliny listové a vit. B12. U zdravého

dospělého se nachází v séru jen nízké koncentrace TK, vyšší hodnoty mohou být u nádorových onemocnění a některých infekcí. U virových infekcí jsou hladiny TK mnohdy až extrémně vysoké. Zvýšené hladiny u pacientů s maligními nádorovými onemocněními jsou především u hematologických maligních onemocnění (lymfomy a především hemoblastózy) v dětském věku. Zde má vyšetření TK kromě významu pro monitorování onemocnění i diagnostický význam. TK může být prakticky zvýšena u všech nádorových onemocnění. Je zvýšena všude tam, kde dochází k rychlému buněčnému dělení, a proto vysokou hladinu nacházíme především u aplastických forem karcinomu a při generalizaci. Je označována za proliferační prognostický nádorový marker. A je především doplňkovým markerem. Z vysoké hladiny lze usuzovat na rychle probíhající progresi nádoru a má tedy charakter markeru prognostického svědčící pro nepříznivou prognózu.

### **MonoTotal (MT)**

Je cytokeratinovým nádorovým markerem tvořeným cytokeratinovými fragmenty. Fyziologicky lze MonoTotal prokázat i v intenzivně se dělících epiteliích různých orgánů vyvíjejícího se plodu. U zdravých dospělých jsou nalézány v malých koncentracích ve tkáni močového měchýře, mléčné žlázy, plic a trávicího ústrojí. Fyziologická funkce je nejasná. Indikace k vyšetření: monitorování nádorů prsu, nádorů kolorekta, nádorů plic, nádorů moč. měchýře (vyšetření v moči) a nádory orofaciální oblasti. Zvýšené hladiny se nacházejí u pacientů s dalšími maligními nádorovými onemocněními - Ca jater, Ca pankreatu, nádory varlat, Ca prostaty, Ca štítné žlázy, Ca ledvin a Ca ovarií. Zvýšené hodnoty jsou i při benigní etiologii onemocnění: hepatitida, jaterní cirhóza, diabetes mellitus, infekce respiračního traktu, benigní onemocnění prsu, benigní onemocnění trávicího ústrojí a pooperační stavy.

### **TPS**

TPS (Tkáňový specifický polypeptidický antigen) patří k solubilním fragmentům cytokeratinů typu středních filament. Obsahuje fragment 8 a 18. Fragmenty cytokeratinů se pravděpodobně uvolňují do tělních tekutin během proliferace nádorových buněk či během nekrózy buněk. Často bývá zařazen mezi proliferační nádorové markery. Ve většině chorobných stavů, a to jak maligních tak benigních, se chová zcela odlišně od výše diskutovaného cytokeratinového markeru MonoTotal. U zdravých dospělých je nalézán v malých koncentracích ve tkáni trávicího ústrojí a plic. TPS přechází do séra jako fragmenty cytoskeletálních proteinů. Fyziologická funkce je nejasná. Indikace k vyšetření nejčastěji uváděné v literatuře jsou



monitorování-Ca ledvin a monitorace Ca ovarií. Z našich zkušeností se využívá při generalizaci nádorového onemocnění do jater. Umožňuje predikovat disease free interval a přežití po radikální chirurgické terapii nebo po onkologické terapii. Zvýšené hodnoty při benigní etiologii onemocnění nacházíme při hepatitidě, jaterní cirhóze, diabetu, bakteriálních infekcích respiračního traktu, benigních onemocněních prsu, při benigních onemocnění trávicího ústrojí (GIT), v prvních dnech po operaci, při revmatických onemocněních a u imuno alteračních onemocněních(3).

### **Studie GPK + OMN FN Plzeň**

#### **CA 125, HE4 a ROMA v diagnostice ovariálního karcinomu**

##### ***Cíle***

Jak bylo uvedeno výše, dosud nebyl objeven nádorový marker, který by se přibližoval „ideálnímu markeru“(3). Až do nedávné doby byl nádorový marker CA125 jediným využívaným nádorovým markerem u pacientek s abnormálním nálezem v pánvi. Je senzitivní avšak málo specifický (9). Po roce 2000 se objevili práce s využitím markeru HE4 (Human epididymis protein 4)(18). Do klinické praxe byl uveden v roce 2009. V posledních několika letech vedla snaha o zvýšení efektivity diagnostického procesu k zavedení ROMA indexu (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) (33). K výpočtu indexu se využívá naměřených hodnot HE4 a CA125 a bere se též v úvahu menopauzální status pacientky. Zjištění řady autorů ohledně senzitivity a specificity HE4 a ROMA indexu jsou velmi povzbudivá, rozhodli jsme se proto ověřit jejich použití v populaci českých žen.

Cílem naší práce bylo vyhodnotit biomarker HE4 a metodiku výpočtu ROMA indexu, které by mohly zvýšit senzitivitu a specifitu dosud používaného nádorového markeru CA125, a dále porovnat jejich senzitivitu a specifitu zejména pro diagnostiku rakoviny vaječnicků a pro některé benigní diagnózy.

##### ***Soubor a metodika***

V období od 24.6.2010 až do 1.12.2011 bylo na Gynekologicko-porodnické klinice UK a FN Plzeň vyšetřeno 552 pacientek s abnormálním nálezem v pánvi. Soubor tvořily dvě skupiny pacientek. 30 žen bylo s histologicky potvrzeným maligním nádorem ovarií. Dalších 522 žen mělo benigní nález. Podle hladiny FSH (folikulostimulačního hormonu) byly ženy v obou skupinách rozděleny na premenopauzální, s hladinou FSH <40IU/L, a postmenopauzální, s hladinou FSH ≥40 IU/L – viz tabulka 1. (34). Protože je nám známo, že v určování menopauzálního statutu žen se používá více metodik a obávali jsme se velkých diskrepancí v získaných výsledcích AUC, senzitivit a specifit při použití různých metodik,

zařadili jsme do naší studie ještě druhou metodiku (33), kdy je pro premenopauzální ženy cut-off FSH <22IU/L a postmenopauzální cut-off FSH  $\geq$ 22 IU/L – viz tabulka 2. (33).

U všech žen byla odebrána krev z kubitální žíly vždy ráno mezi 7 -10 hodinou do odběrových zkumavek VACUETTE®, (Greiner Bio-One, Rakousko) na stanovení CA 125, HE4 a FSH. Sérum bylo odděleno centrifugací při  $1700 \times g$  po dobu 10 minut a vzorky byly buď okamžitě zpracovány nebo pokud je nebylo možno zpracovat do 24 hodin byly uchovávány až do doby stanovení při  $-80^{\circ}\text{C}$ . CA125 a HE4 byly stanovovány chemiluminiscenční metodou na přístroji Architect 1000i (Abbott, USA), FSH chemiluminiscenční metodou na přístroji DxI 800 (Beckman Coulter, USA). Kromě toho byl v souladu s pracemi Moora a spol. (33) u všech premenopauzálních žen vypočítán ROMA1 index a u všech postmenopauzálních žen ROMA2 index. Pro deskriptivní statistiku a pro výpočet dalších potřebných parametrů byl použit statistický software SAS 9.2 (Statistical Analysis Software release 9.2).

### **Výsledky**

V tabulkách 3-6 je uveden přehled základních parametrů porovnávaných skupin pacientek. U sledovaných markerů CA125, HE4 a dále ROMA indexů je vždy uvedena AUC, senzitivita, specificita, pozitivní (PV+) a negativní (PV-) prediktivní hodnota a relativní riziko (RR) pro hodnotu cut-off používaného v současné době v naší rutinní praxi. Tyto cut-off bez rozdílu věku a menopauzálního stavu jsou následující: pro CA125 35 IU/ml, HE4 89 pmol/l, index ROMA1 < 7.4 % a ROMA2 < 25,3 %. Na druhém řádku jsou vždy uvedeny hodnoty, které odpovídají specificitě 95% pro hodnocený marker. Dle metodiky výpočtu ROMA indexu (33) je pro ženy po menopauze – viz tabulka 3 a 5 - uvedena hodnota indexu ROMA2, pro ženy před menopauzou pak následující tabulky 4 a 6 - uvádí hodnotu indexu ROMA1. Výsledky jsou uvedeny u dvou způsobů určování menopauzálního statusu žen. V prvním případě je použit cut-off FSH 40 IU/l (34) a v druhém případě cut-off FSH 22 IU/l(33). Při takto razantní změně cut-off FSH došlo ke změně počtu žen v jednotlivých skupinách – viz tabulky 1 a 2. Předpokládali jsme výrazné změny specifit, senzitivit a AUC. Naše předpoklady se však nenaplnily.

### **Diskuze**

Současná praxe na našem pracovišti je taková, že již při první návštěvě je pacientce s abnormálním nálezem v pánevi odebrána krev na vyšetření markerů: CA125 a HE4, je stanovena hodnota FSH a vypočten ROMA index. Současně je provedeno komplexní gynekologické vyšetření a expertní ultrazvukové vyšetření, a tím jsou během jednoho sezení získány komplexní informace o povaze abnormálního pánevního nálezu.

S ohledem na věkovou distribuci epiteliálního ovariálního karcinomu jsme se soustředili

zejména na skupinu postmenopauzálních pacientek. Data z našeho souboru ukazují, že největší výtěžnost námi užívaného one-step postupu pro postmenopauzální pacientky je dosaženo, pokud kombinujeme oba markery CA125 a HE4. Tehdy při stanovení menopauzálního statutu dle hodnot FSH při cut-off pro menopauzu 40 IU/l a při cut-off 25,3% pro ROMA2, resp. námi nejbližší kalkulované hodnotě 26,4%, dosahuje ROMA2 senzitivity 92,3%, specificity 88,5 % a PV- 99,3%. Pokud snížíme cut-off FSH pro laboratorní diagnózu menopauzy na 22 IU/l, potom při cut-off 25,3%, resp. námi nejbližší kalkulované hodnotě 26,3 %, dosahuje ROMA2 senzitivity 95,2 %, specificity 87,8 % a PV- 99,5 %.

Moore et al. v roce 2009 publikovali v *Gynecologic Oncology* výsledky multicentrické prospektivní studie na 531 pacientkách. Tehdy při cut-off 27,7% pro ROMA2 byla senzitivita 92,3%, specificita 74,7% a PV- 92,6%. Pro ROMA1, zmíněný níže, při cut-off 13,1% byla senzitivita 76,5%, specificita 74,8% a negativní prediktivní hodnota 95%(24). Stejný autor v roce 2011 v *Obstetrics&Gynecology* uvedl výsledky dalšího souboru 472 pacientek. V této kohortě dosahoval ROMA2 senzitivity 90,2% při specificitě 76% a PV- 95,8%. ROMA1 dosáhl senzitivity 81,3% při specificitě 74,2% a PV- 98,3%. (33) Naše zjištění jsou v souladu s nálezy těchto studií.

Pro samotný marker CA125, při stanovení menopauzálního statutu dle hodnot FSH při cut-off pro menopauzu 40 IU/l a při cut-off 35 IU/ml pro CA125, resp. námi nejbližší stanovené hodnotě 36 IU/ml, dosahuje CA125 senzitivity 92,3%, specificity 85,3 % a PV- 99,3%. Pokud snížíme cut-off FSH pro laboratorní diagnózu menopauzy na 22 IU/l, potom při cut-off 35 IU/ml, resp. námi nejbližší stanovené hodnotě 36 IU/ml, dosahuje CA125 senzitivity 95,2%, specificity 84,6% a PV- 99,5%.

Marker HE4, při stanovení menopauzálního statutu dle hodnot FSH při cut-off pro menopauzu 40 IU/l a při cut-off 89 pmol/l pro HE4, dosahuje senzitivity 76,9%, specificity 86,2% a PV- 98,0%, pokud snížíme cut-off FSH pro laboratorní diagnózu menopauzy na 22 IU/l, potom při cut-off 89 pmol/l dosahuje HE4 senzitivity 71,4%, specificity 87,5% a PV- 97,1%.

Z výše uvedeného vyplývá, že kombinace obou markerů zlepšuje výsledky, kterých dosahuje marker CA125 samotný. Navíc kolem 20% epiteliálních ovariálních karcinomů vykazuje malou, pokud nějakou, expresi CA125, a tudíž samotný marker CA125 může být nedostatečný. U více než 50% těchto malignit můžeme pozorovat zvýšené hladiny HE4, a proto kombinace markerů může tyto pacientky, resp. ovariální malignity u těchto pacientek zachytit (22).

Další faktor podporující kombinaci obou markerů, CA125 a HE4, je ten, že zvýšené hodnoty CA125 je možné naměřit u fyziologických stavů jako je menstruace, gravidita, dále u

benigních nádorů ovarií, zánětů, u endometriózy a při přítomnosti myomů. Tato falešná pozitivita může ve skupině premenopauzálních pacientek činit v běžné klinické praxi potíže. Proto kombinace markerů CA125 s HE4 zvyšující specifitu a senzitivitu vyšetření, je pro triage pacientek významným posunem vpřed.

Situace u premenopauzálních pacientek je v některých aspektech odlišná, proto při stanovení menopauzálního statusu dle hodnot FSH při cut-off pro menopauzu 40 IU/l a při cut-off 7,4% pro ROMA1, resp. námi nejbližší kalkulované hodnotě 7,5%, dosahuje ROMA1 senzitivity 70,5%, specifity 83,2% a PV- 98,2%. Pokud snížíme cut-off FSH pro laboratorní diagnózu menopauzy na 22 IU/l, potom při cut-off 7,4%, resp. námi nejbližší kalkulované hodnotě 7,3%, dosahuje ROMA1 senzitivity 55,5%, specifity 84,8% a PV- 98,3%. Cut-off CA125 je na našem pracovišti identický pro obě skupiny pacientek, pre- i postmenopauzální, 35 IU/l. Ve shodě se zahraničními pracovišti se však jeví jako přínosný posun horní hranice normy u premenopauzální skupiny na hodnoty cca dvojnásobné, tj. 70-80 IU/l. Na rozdíl od pacientek postmenopauzálních, u premenopauzálních jsme dosáhli ve sledovaném souboru nejvyšší senzitivity 94,1%, specifity 89,2% při cut-off 68 IU/ml. Laboratorní známkou menopauzy byla opět hodnota FSH 40 IU/l. Při cut-off FSH 22 IU/l byla senzitivita 88,8%, specifita 91,2% při cut-off 85 IU/ml. HE4 u skupiny premenopauzálních pacientek, při stanovení menopauzálního statusu dle hodnot FSH při cut-off pro menopauzu 40 IU/l a při cut-off 89 pmol/l pro HE4, resp. námi nejbližší stanovené hodnotě 88 pmol/l, dosahuje senzitivity 52,9%, specifity 96,8% a PV- 97,6%. Pokud snížíme cut-off FSH pro laboratorní diagnózu menopauzy na 22 IU/l, potom při cut-off 89 pmol/l, resp. námi nejbližší stanovené hodnotě 86 pmol/l, dosahuje HE4 senzitivity 44,4%, specifity 97,9% a PV- 98,2%.

Pokud budeme sledovat výsledky ROC analýzy se zaměřením na cut-off jednotlivých markerů a jejich kombinací odpovídající 95% specifitě, bude situace u skupiny pre- a postmenopauzálních pacientek následující.

Největší výtěžnost ve skupině postmenopauzálních pacientek opět dosahuje kombinace markerů CA125 a HE4. Při cut-off FSH 40 IU/l a při hranici specifity 95%, dosahuje ROMA2 senzitivity blízké se 85% při cut-off 37,7%. Při cut-off FSH 22 IU/l je situace identická. Marker CA125 užívaný se skupině postmenopauzálních pacientek při cut-off FSH 40 IU/l a při hranici specifity 95%, dosahuje senzitivity blízké se 85% při cut-off 63 IU/l. Při cut-off FSH 22 IU/l a při hranici specifity 95%, dosahuje senzitivity blízké se 81% při cut-off 81 IU/l. Samotný marker HE4 v této sledované kohortě při cut-off FSH 40 IU/l a při hranici specifity 95%, dosahuje senzitivity blízké se 77 % při cut-off 115 pmol/l. Při cut-off FSH 22 IU/l a při hranici specifity 95%, dosahuje senzitivity blízké se 72% při cut-off 112

pmol/l. ROMA1, při cut-off pro laboratorní diagnózu menopauzy FSH 40 IU/l a při hranici specificity 95%, dosahuje senzitivity blížící se 59% při cut-off 19,9%. Při cut-off FSH 22 IU/l a při hranici specificity 95%, dosahuje senzitivity blížící se 56% při cut-off 17,6%.

CA125 užívaný samostatně ve skupině premenopauzálních pacientek při cut-off FSH 40 IU/l a při hranici specificity 95%, dosahuje senzitivity blížící se 59% při cut-off 130 IU/l. Při cut-off FSH 22 IU/l a při hranici specificity 95%, dosahuje senzitivity blížící se 45% při cut-off 143 IU/l. Samotný marker HE4 u premenopauzálních pacientek při cut-off FSH 40 IU/l a při hranici specificity 95%, dosahuje senzitivity blížící se 53% při cut-off 80 pmol/l. Při cut-off FSH 22 IU/l a při hranici specificity 95%, dosahuje senzitivity blížící se 56% při cut-off 74 pmol/l.

Chang et al. publikovali v červenci 2011 v International Journal of Gynecological Cancer výsledky studie na 491 čínských ženách, kde sledovali senzitivitu a specificitu samotných markerů HE4 oproti CA125 a tytéž parametry u kombinace HE4 s CA125. Senzitivita pro ovariální karcinom, při porovnávací skupině pacientek s benigním ovariálním nálezem, byla při 95% specificitě u HE4 74%, CA125 82% a kombinace markerů dosáhla 86%. Při 98% specificitě dosáhla HE4 senzitivity 72%, CA125 68% a kombinace markerů 76%(30). Námi získané hodnoty jsou v souladu s nálezy této studie.

AUC, senzitivita a negativní prediktivní hodnota pro sledované markery či jejich kombinace vztažené k věku a FSH, byla vždy největší pro ROMA2, následně CA125, ROMA1 a HE4. Tyto naše údaje jsou ve shodě s prací Partheen et al. ze Švédska, jejichž studie hodnotila soubor 394 pacientek(31).

### **Závěr**

Ovariální karcinom je svojí incidencí a vysokou mortalitou celosvětovým problémem. Jedním z důvodů je chybějící symptomatologie časných stádií a dalším z důvodů je zatím neexistující screening. Donedávna byl jediným rutinně užívaným markerem pro ovariální abnormality marker CA125. V naší práci jsme na populaci českých žen dokázali, že marker HE4 dosahuje senzitivity i specificity použitelné v každodenní praxi. Kombinace markerů HE4 a CA125 a současný výpočet ROMA indexu je vhodnou metodikou pro zlepšení záchytu ovariálního karcinomu.

**Tato studie byla podpořena z grantu MZ ČR IGA NS 10258-3.**

Tabulka 1 - Počet žen ve skupinách po rozdělení podle FSH cut-off 40 IU/l a diagnóz

| Diagnóza       | FSH $\geq$ 40 IU/l | FSH <40 IU/l | Celkem     |
|----------------|--------------------|--------------|------------|
| <b>Benigní</b> | <b>177</b>         | <b>345</b>   | <b>522</b> |
| <b>Maligní</b> | <b>13</b>          | <b>17</b>    | <b>30</b>  |
| <b>Celkem</b>  | <b>190</b>         | <b>362</b>   | <b>552</b> |

Tabulka 2 - Počet žen ve skupinách po rozdělení podle FSH cut-off 22 IU/l a diagnóz

| Diagnóza       | FSH $\geq$ 22 IU/l | FSH <22 IU/l | Celkem     |
|----------------|--------------------|--------------|------------|
| <b>Benigní</b> | <b>235</b>         | <b>287</b>   | <b>522</b> |
| <b>Maligní</b> | <b>21</b>          | <b>9</b>     | <b>30</b>  |
| <b>Celkem</b>  | <b>256</b>         | <b>296</b>   | <b>552</b> |

Tabulka 3 - Ženy po menopauze (cut-off FSH  $\geq$ 40 IU/l), maligní vs. benigní

| Metoda        | AUC<br>maligní<br>vs.<br>benigní | cut-off      | Specificita    | Senzitivita | PV+     | PV-     | RR      |
|---------------|----------------------------------|--------------|----------------|-------------|---------|---------|---------|
| <b>CA 125</b> | 0.97153                          | <b>36.00</b> | 85.3107        | 92.3077     | 31.5789 | 99.3421 | 48.0000 |
|               |                                  | 63.00        | <b>94.9153</b> | 84.6154     | 55.0000 | 98.8235 | 46.7500 |
| <b>HE4</b>    | 0.93451                          | <b>89.00</b> | 86.2857        | 76.9231     | 29.4118 | 98.0519 | 15.0980 |
|               |                                  | 115.00       | <b>94.8571</b> | 76.9231     | 52.6316 | 98.2249 | 29.6491 |
| <b>ROMA 2</b> | 0.97767                          | <b>26.40</b> | 88.5057        | 92.3077     | 37.5000 | 99.3548 | 58.1250 |
|               |                                  | 37.70        | <b>94.8276</b> | 84.6154     | 55.0000 | 98.8024 | 45.9250 |

Tabulka 4 - Ženy před menopauzou (cut-off FSH <40 IU/l), maligní vs. benigní

| Metoda        | AUC<br>maligní<br>vs.<br>benigní | cut-off      | Specificita    | Senzitivita | PV+     | PV-     | RR      |
|---------------|----------------------------------|--------------|----------------|-------------|---------|---------|---------|
| <b>CA 125</b> | 0.95337                          | <b>68.00</b> | 89.2754        | 94.1176     | 30.1887 | 99.6764 | 93.2830 |
|               |                                  | 130.00       | <b>95.0725</b> | 58.8235     | 37.0370 | 97.9104 | 17.7249 |
| <b>HE4</b>    | 0.87016                          | <b>88.00</b> | 96.8116        | 52.9412     | 45.0000 | 97.6608 | 19.2375 |
|               |                                  | 80.00        | <b>95.0725</b> | 52.9412     | 34.6154 | 97.6190 | 14.5385 |
| <b>ROMA 1</b> | 0.88166                          | <b>7.50</b>  | 83.2353        | 70.5882     | 17.3913 | 98.2639 | 10.0174 |
|               |                                  | 19.90        | <b>95.0000</b> | 58.8235     | 37.0370 | 97.8788 | 17.4603 |

Tabulka 5 - Ženy po menopauze (FSH  $\geq$ 22 IU/l), maligní vs. benigní

| Metoda        | AUC<br>maligní<br>vs.<br>benigní | cut-off      | Specificita    | Senzitivita | PV+     | PV-     | RR      |
|---------------|----------------------------------|--------------|----------------|-------------|---------|---------|---------|
| <b>CA 125</b> | 0.97315                          | <b>36.00</b> | 84.6809        | 95.2381     | 35.7143 | 99.5000 | 71.4286 |
|               |                                  | 81.00        | <b>94.8936</b> | 80.9524     | 58.6207 | 98.2379 | 33.2672 |
| <b>HE4</b>    | 0.91518                          | <b>89.00</b> | 87.5536        | 71.4286     | 34.0909 | 97.1429 | 11.9318 |
|               |                                  | 112.00       | <b>94.8498</b> | 71.4286     | 55.5556 | 97.3568 | 21.0185 |
| <b>ROMA 2</b> | 0.98031                          | <b>26.30</b> | 87.8788        | 95.2381     | 41.6667 | 99.5098 | 85.0000 |
|               |                                  | 37.70        | <b>95.2381</b> | 85.7143     | 62.0690 | 98.6547 | 46.1379 |

Tabulka 6 - Ženy před menopauzou (FSH <22 IU/l), maligní vs. benigní

| Metoda        | AUC<br>maligní<br>vs.<br>benigní | cut-off      | Specificita    | Senzitivita | PV+     | PV-     | RR      |
|---------------|----------------------------------|--------------|----------------|-------------|---------|---------|---------|
| <b>CA 125</b> | 0.94696                          | <b>85.00</b> | 91.2892        | 88.8889     | 24.2424 | 99.6198 | 63.7576 |
|               |                                  | 143.00       | <b>95.1220</b> | 44.4444     | 22.2222 | 98.2014 | 12.3556 |
| <b>HE4</b>    | 0.81611                          | <b>86.00</b> | 97.9094        | 44.4444     | 40.0000 | 98.2517 | 22.8800 |
|               |                                  | 74.00        | <b>95.1220</b> | 55.5556     | 26.3158 | 98.5560 | 18.2237 |
| <b>ROMA 1</b> | 0.83235                          | <b>7.30</b>  | 84.8057        | 55.5556     | 10.4167 | 98.3607 | 6.35417 |
|               |                                  | 17.60        | <b>95.0530</b> | 55.5556     | 26.3158 | 98.5348 | 17.9605 |

### Léčba ovariálních malignit

Základní léčebnou modalitou ovariálního karcinomu je léčba chirurgická. Je vyžadován tzv. „optimální debulking“ = maximální cytoredukce s nulovým pooperačním nádorovým reziduem. Střední přežití vzrůstá o 5,5% s každými 10% cytoredukčního výkonu. Dle některých prací se udává přežití pacientek ve III. stadiu onemocnění ve vztahu k velikosti pooperačního nádorového rezidua: R0 – 52 měsíců, R<2 cm – 28 měsíců, R>2 cm – 13 měsíců.

Operační výkon se skládá z těchto částí: dolní střední laparotomie s možností rozšíření do nadbřišku, laváž/odběr ascitu, explorace dutiny břišní, exstirpace adhezí, exstirpace všech suspektních ložisek a metastaticky postižených tkání i za cenu resekčních výkonů na postižených orgánech, random /náhodné/ biopsie, extrafasciální hysterektomie, oboustranná adnexektomie, omentektomie totální resp. infrakolická, apendektomie, pánevní a paraaortální lymfadenektomie.

IDS /interval debulking surgery/ je časná 2. operace po 3-4 seriích chemoterapie po neradikální operaci, operaci s reziduem, po probatorní laparotomii či laparoskopii, po biopsii či punkci ascitu s průkazem maligních buněk.

Další léčebnou metodou je chemoterapie a to buď neoadjuvantní /před cytoredukčním operačním výkonem/, adjuvantní /po cytoredukčním výkonu k léčbě reziduální nemoci/,



kurativní /po výkonu s R=0 k léčbě mikroskopické nemoci/ či paliativní /s cílem redukovat velikost tumoru či snížit potíže pacientky/. Chemoterapie je aplikována pacientce téměř vždy s výjimkou stadia Ia, Ib G1.

V 1. linii je aplikován platinový derivát + taxan, a to zpravidla 6-8 cyklů.

Ve 2. a další linii záleží volba preparátu na intervalu recidivy od primární léčby, event. perzistujících nežádoucích projevech úvodní chemoterapie, objemu tumoru v době recidivy a hladině nádorových markerů. Postup je vždy individualizován.

V onkologii další běžně užívaná léčebná modalita, adjuvantní či primární radioterapie, není běžně u pacientek s karcinomem ovaria indikována. Vzhledem ke vzorci šíření ovariálních malignit a rozsahu postižení k době diagnózy ve III. a IV. stadiu je celobřišní ozáření (WART – whole abdomen radiotherapy) minoritním léčebným přístupem. Konzolidační radioterapie přináší velmi kontroverzní výsledky, salvage léčba lze využít u pacientek s minimální chorobou rezistentní na platinový derivát a paliativní radioterapie lze připustit u nálezů recidiv izolovaných v pánvi.

U 60% pacientek dojde během 2 let k recidivě onemocnění i při optimální úvodní léčbě. Toto riziko stoupá se stadiem nemoci v době diagnózy. Od projevu recidivy je průměrná doba přežívání kratší než 2 roky, 5 leté přežití je menší než 10%. Nejčastějším projevem recidivy je ascites a karcinomatosa peritonea, dále pak recidiva v lymfatických uzlinách či lokálně v pánvi. Vzdálené postižení se projevuje hlavně v játrech, v plicích a na pleuře.

Se znalostí této skutečnosti se jeví nová biologická léčba bevacuzimabem /Avastin/ - inhibitor VEGF /růstový faktor cévního endotelu/ → inhibitor angiogeneze, jako vhodný doplněk stávajícího schématu chemoterapie taxanem a platinovým derivátem u pacientek s pokročilým karcinomem vaječníku. Dle výsledků studií /GOG-0218 a ICON7/ současné podávání bevacuzimabu s chemoterapií 1. linie a pokračování v monoterapii po dokončení chemoterapie do 12 až 15 měsíců dle schématu, prodlužuje PFS /progression free survival – přežití bez progresse/.

## **Sledování po léčbě = follow-up**

Jestliže je léčbou dosaženo klinické remise, je pacientka zařazena do programu následného sledování – dispenzarizace – follow-up.

Schéma v současnosti užívaného oficiálního doporučeného postupu follow-up pacientek po léčbě karcinomu ovaria:

*Převzato z Zikán M., Cibula D., Fischerová D. et al: Guideline gynekologických zhoubných*

Pacientku dispenzarizuje a kontroluje pracoviště, které provádí komplexní léčbu.

V současné době lze nalézt data podporující jak aktivní přístup (opatření směřující k časně detekci často asymptomatické recidivy), tak přístup symptomatický (důraz je kladen na symptomy případné recidivy). Obtížné je jasně definovat pacientky, které budou profitovat z jednoho nebo druhého přístupu. Postup je možno volit na základě zkušeností pracoviště a průběhu onemocnění a léčby u konkrétní pacientky s přihlédnutím k přání pacientky.

**A) aktivní přístup** – pacientka, která může profitovat z časně detekce recidivy, s vysokou pravděpodobností možné sekundární chirurgické léčby

- 1.,2. a 3. rok každé 3 měsíce

- 4.,5. rok každých 6 měsíců

- poté jednou ročně

- kontroly standardně: komplexní gynekologické vyšetření; CA 125 a zobrazovací vyšetření dle zvyklostí pracoviště (v případě fertilitu šetřící léčby vždy ultrazvukové vyšetření ponechaného ovaria)

- mamografie po 45. roku věku á 1-2 roky

- další vyšetření pouze dle symptomatologie a klinické indikace (CT, RTG S+P a jiná)

**B) symptomatický přístup** – pacientka s vysokým rizikem recidivy nádoru, s nízkou pravděpodobností sekundární chirurgické léčby

- komplexní gynekologické vyšetření se zaměřením na symptomy, nežádoucí účinky léčby a kvalitu života; každé 3 měsíce

**C) kombinovaný přístup**

- první rok dle B, dále dle A

### *ESGO usnesení k roli stanovení CA 125 u pacientek ve follow-up ovariálního karcinomu (14, 15)*

Na podkladě studií OV05/EORTC 55955 týkajících se využití CA 125 ve follow-up pacientek s ovariálním karcinomem vypracovalo ESGO doporučení, že je možné upustit od rutinního monitorování CA 125 krom skupiny žen, které by mohli profitovat z včasné detekce vzestupné dynamiky CA125. Je tedy doporučeno, začlenit CA 125 do follow-up pacientek po

úplné odpovědi na primární léčbu – v klinické remisi, které byly nebo jsou léčeny v rámci klinických studií, které byly shledány vhodnými pro budoucí studie se second-line terapií, u kterých se předpokládá, že nebudou z různých důvodů pravidelně vyšetřovány v rámci follow-up každé 3 měsíce včetně zobrazovacích metod, a které by mohli profitovat ze sekundárního výkonu při zjištění rekurence onemocnění.

Vždy je nutné pacientce vysvětlit smysl follow-up vč. odběrů CA 125 a seznámit ji s faktem, že zjištěná elevace CA 125 nemusí nutně vést k chirurgické či onkologické intervenci.

### Prognóza pacientek s karcinomem ovaria

Prognóza pacientek s karcinomem ovaria závisí na několika faktorech, především(3):

- na stadiu onemocnění v době diagnózy
- na reziduálním objemu tumoru po provedené chirurgické léčbě (u pokročilých nálezů)
- na věku a na celkovém stavu (komorbidity, limitace agresivity léčby ve starším věku)
- důležitou roli hraje i histologický typ nádoru. Grade hraje roli zejména ve stadiu I.

*Pětileté přežití pacientek s karcinomem vaječníku v závislosti na stadiu onemocnění (převzato z Cibula D, Petruželka L: Onkogynekologie. Praha, Grada Publishing, a.s., 2009)*

| Stadium          | Pětileté přežití |
|------------------|------------------|
| IA G1            | 90%              |
| IA G>1           | 60-85%           |
| IB, IC, IIA, Gx  | 40-60%           |
| IIB, IIC, III R0 | 20-40%           |
| III (R < 2 cm)   | 15-25%           |
| III (R > 2 cm)   | 5-15%            |
| IV               | <5%              |

R = reziduální tumor

### Screening ovariálního karcinomu (3)

Funkční organizovaný screening ovariálního karcinomu dosud neexistuje. Jak bylo uvedeno v úvodu, karcinom ovaria má špatnou prognózu zejména kvůli pozdní detekci v pokročilých stadiích. Proto je celosvětově věnována pozornost možnostem vyhledávání - screeningu

časných stadií. Jsou diskutovány dvě strategie:

- populační screening /dosud považován za náročný, drahý, málo efektivní/ a
- screening zaměřený na rizikovou skupinu pacientek s familiárním výskytem ovariálních či jiných malignit v rámci hereditárních syndromů zmíněných výše /kombinace CA125, ev. HE4 a sonografického vyšetření/.

Dosavadní výsledky těchto snažení však nejsou nijak uspokojivé a nepřinášejí výrazné zlepšení výsledků hlavních pozorovaných ukazatelů, zejména celkového přežití /OS/(3).

Ve Velké Británii v současnosti stále probíhá asi dosud největší prospektivní randomizovaná studie – UKCTOCS – UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening, jejíž výsledky budou k dispozici v roce 2015. Tato studie si klade za cíl sestavení schématu pro populační screening. Rozbor designu této studie překračuje rámec tohoto sdělení, avšak vzhledem k předpokládanému pozitivnímu dopadu odkazují na web:

[http://www.instituteforwomenshealth.ucl.ac.uk/academic\\_research/gynaecologicalcancer/gcrc/ukctocs/design](http://www.instituteforwomenshealth.ucl.ac.uk/academic_research/gynaecologicalcancer/gcrc/ukctocs/design)

Co se týká pacientek s familiárním karcinomem vaječníku, tak i na tuto skupinu je v současnosti zaměřena studie probíhající ve Velké Británii – UKFOCSS – UK Familial Ovarian Cancer Screening Study. Více viz web: [http://www.instituteforwomenshealth.ucl.ac.uk/academic\\_research/gynaecologicalcancer/gcrc/ukfocss/trial-design](http://www.instituteforwomenshealth.ucl.ac.uk/academic_research/gynaecologicalcancer/gcrc/ukfocss/trial-design).

### **Výsledky:**

Premenopausálních ženy -,během menstruačního cyklu v období ovulačního peaku dochází k mírnému vzestupu AFP, CA 125 a HE 4. Ostatní sledované markery se měnily minimálně nebo vůbec.

Těhotné ženy v I. a II. trimestru mění hladiny AFP, a také CA 125 a v ojedinělých případech HE4, Ostatní nádorové markery se neměnily.

Postmenopausálních žen, jsme výskyt falešné positivity markeru jsme neprokázali. Kuřáci dochází ke zvýšení CEA, ale tato falešná pozitivita je relativně malá takže jen minimálně ovlivňuje interpretaci výsledku.

Vyšetření per rektum, kolonoskopie, bronchoskopie výrazně mění hodnoty nádorových markerů a odběr by měl vždy předcházet těmto vyšetřením.

Zánětlivá onemocnění virové etiologie ovlivňují především Chromogranin A a mucinové nádorové markery,

Bakteriálních zánětů

Výpotky v pohrudniční dutině nebo ascites vedou k extrémnímu zvýšení hladin CA 125 bez jakéhokoliv vztahu k etiologii výpotku.

#### Ascites

Chronická renální insuficience vede prakticky k extrémnímu zvýšení hodnot nádorových markerů. Autoimunitní onemocnění trávicího ústrojí zvyšují CA 125, CA 19-9 a Chromograninu A.

K extrémnímu zvýšení hodnot Chromograninu A vede léčba blokátory protonové pumpy a je často mylně interpretováno jako karcinoid syndrom. Obdobně extrémní zvýšení CA 125 u zánětů v malé pánvi vede k nesprávné interpretaci, podezření na diagnózu nádorů ovaria.

#### **Závěry:**

Pro lékaře znamená vyšetření nádorových markerů ve správném panelu, čase a frekvenci pomocníka ke zjištění podezření na časnou recidivu onemocnění a umožní mu zahájit diagnostický proces k jejímu odhalení.

Pro nemocného znamená zvýšená jen jedna hodnota markeru pouze námět na diskusi s lékařem, který by mu měl limitovanou výpovědní hodnotu, zejména náhodného výběru, vysvětlit.

Znalost faktorů, které mohou výsledek ovlivnit je nezbytně nutná pro optimální indikaci a interpretaci nádorových markerů.

## Seznam použité literatury

---

1. Registry NC. Cancer Incidence 2011. Health Statistics. Czech republic, Prague 2014.
2. Jurga LM. Klinická a radiačná onkológia. Martin: Osveta; 2010.
3. Cibula D. Onkogynekologie. Praha: Grada Publishing, a.s.; 2009.
4. Ayhan A. Textbook of Gynaecological Oncology. Ostim/Ankara/Turkey: Günes Publishing; 2012. 1138 p.
5. Yurkovetsky Z, Skates S, Lomakin A, Nolen B, Pulsipher T, Modugno F, et al. Development of a multimarker assay for early detection of ovarian cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(13):2159-66.
6. Nolen B, Velikokhatnaya L, Marrangoni A, De Geest K, Lomakin A, Bast RC, Jr., et al. Serum biomarker panels for the discrimination of benign from malignant cases in patients with an adnexal mass. *Gynecol Oncol*. 2010;117(3):440-5.
7. Racek J. Klinická biochemie. Praha: Galén; 1999. 317 p.
8. Bast RC, Jr., Klug TL, St John E, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H, et al. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *The New England journal of medicine*. 1983;309(15):883-7.
9. Fritsche HA, Bast RC. CA 125 in ovarian cancer: advances and controversy. *Clinical chemistry*. 1998;44(7):1379-80.
10. Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UH, Lilja H, Brunner N, Chan DW, et al. National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. *Clinical chemistry*. 2008;54(12):e11-79.
11. Duffy MJ, Bonfrer JM, Kulpa J, Rustin GJ, Soletormos G, Torre GC, et al. CA125 in ovarian cancer: European Group on Tumor Markers guidelines for clinical use. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2005;15(5):679-91.
12. Van Calster B, Timmerman D, Bourne T, Testa AC, Van Holsbeke C, Domali E, et al. Discrimination between benign and malignant adnexal masses by specialist ultrasound examination versus serum CA-125. *Journal of the National Cancer Institute*. 2007;99(22):1706-14.
13. Van Calster B, Valentin L, Van Holsbeke C, Zhang J, Jurkovic D, Lissoni AA, et al. A novel approach to predict the likelihood of specific ovarian tumor pathology based on serum CA-125: a multicenter observational study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2011;20(11):2420-8.
14. van der Zee AG, Colombo N, Gitsch G, Reed N, Amant F, Cibula D, et al. ESGO statement on the role of CA-125 measurement in follow-up of epithelial ovarian cancer. *International journal of*

gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society. 2012;22(1):175.

15. Verheijen RH, Cibula D, Zola P, Reed N. Cancer antigen 125: lost to follow-up?: a European society of gynaecological oncology consensus statement. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society.* 2012;22(1):170-4.

16. Kalogera E, Scholler N, Powless C, Weaver A, Drapkin R, Li J, et al. Correlation of serum HE4 with tumor size and myometrial invasion in endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2012;124(2):270-5.

17. Kirchhoff C, Habben I, Ivell R, Krull N. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. *Biology of reproduction.* 1991;45(2):350-7.

18. Hellstrom I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, Ledbetter JA, Schummer M, McIntosh M, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer research.* 2003;63(13):3695-700.

19. Clauss A, Lilja H, Lundwall Å. The evolution of a genetic locus encoding small serine proteinase inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2005;333(2):383-9.

20. Bingle L, Cross SS, High AS, Wallace WA, Rassl D, Yuan G, et al. WFDC2 (HE4): a potential role in the innate immunity of the oral cavity and respiratory tract and the development of adenocarcinomas of the lung. *Respiratory research.* 2006;7:61.

21. Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, Mok SC, Crum CP, Welch WR, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer research.* 2005;65(6):2162-9.

22. Moore RG, Brown AK, Miller MC, Skates S, Allard WJ, Verch T, et al. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecologic Oncology.* 2008;108(2):402-8.

23. Anastasi E, Marchei GG, Viggiani V, Gennarini G, Frati L, Reale MG. HE4: a new potential early biomarker for the recurrence of ovarian cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine.* 2010;31(2):113-9.

24. Moore RG, McMeekin DS, Brown AK, DiSilvestro P, Miller MC, Allard WJ, et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol.* 2009;112(1):40-6.

25. Jacobs IJ, Menon U. Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer. *Molecular & cellular proteomics : MCP.* 2004;3(4):355-66.

26. Bast RC, Jr., Badgwell D, Lu Z, Marquez R, Rosen D, Liu J, et al. New tumor markers: CA125 and beyond. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society.* 2005;15 Suppl 3:274-81.

27. Rosenthal AN, Menon U, Jacobs IJ. Screening for ovarian cancer. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2006;49(3):433-47.
28. Escudero JM, Auge JM, Filella X, Torne A, Pahisa J, Molina R. Comparison of serum human epididymis protein 4 with cancer antigen 125 as a tumor marker in patients with malignant and nonmalignant diseases. *Clinical chemistry*. 2011;57(11):1534-44.
29. Sandri MT, Bottari F, Franchi D, Boveri S, Candiani M, Ronzoni S, et al. Comparison of HE4, CA125 and ROMA algorithm in women with a pelvic mass: correlation with pathological outcome. *Gynecol Oncol*. 2013;128(2):233-8.
30. Chang X, Ye X, Dong L, Cheng H, Cheng Y, Zhu L, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) as a serum tumor biomarker in patients with ovarian carcinoma. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2011;21(5):852-8.
31. Parthen K, Kristjansdottir B, Sundfeldt K. Evaluation of ovarian cancer biomarkers HE4 and CA-125 in women presenting with a suspicious cystic ovarian mass. *Journal of gynecologic oncology*. 2011;22(4):244-52.
32. Sedlaczek P, Frydecka I, Gabrys M, Van Dalen A, Einarsson R, Harlozinska A. Comparative analysis of CA125, tissue polypeptide specific antigen, and soluble interleukin-2 receptor alpha levels in sera, cyst, and ascitic fluids from patients with ovarian carcinoma. *Cancer*. 2002;95(9):1886-93.
33. Moore RG, Miller MC, Disilvestro P, Landrum LM, Gajewski W, Ball JJ, et al. Evaluation of the diagnostic accuracy of the risk of ovarian malignancy algorithm in women with a pelvic mass. *Obstetrics and gynecology*. 2011;118(2 Pt 1):280-8.
34. Čepický P. Doporučení k hormonální terapii a substituci perimenopauzy a postmenopauzy. *Česká gynekologie*. 2006;71(2):150-2.



F.

**UNIVERZITA KARLOVA PRAHA  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI**

**BIOMARKERY V ONKOLOGII**

**Juraj Kaušitz, Ondřej Topolčan  
Marie Karlíková, Šárka Svobodová a kolektiv  
autorů**

**Editor:**

**Doc. RNDr. Judita Kinkorová, Ph.D.**

*Sponsored by OP VK CZ.1.07/2.3.00/20.0040*

**Autoři :**

**Doc. MUDr. Juraj Kaušitz , CSc.**

**Prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc**

**RNDr Marie Karlíková Ph.D.**

**MUDr. Miroslava Časová**

**MUDr. Šárka Svobodová, Ph.D.**

**Josep Augé Fradera**

**Prof. Vivien Barac**

**Zdena Bartošová**

**Vincenzo Costigliola**

**Eva Kaušitzová**

**Lujza Sabolová**

**Luboslav Sanislo**

**Katarína Závodná**

**Mária Zezulová**

ISBN 978-80-263-0820-1

## Úvod

Nádorové markery patří dnes ke standardním diagnostickým prostředkům. Během posledních dvaceti let se podstatně rozšířila paleta použitelných markerů, z nichž mnohé reagují při více diagnózách. Často se měří současně několik markerů. V průběhu pacientova onemocnění jsou markery měřeny opakovaně a je užitečné sledovat dynamiku jejich vývoje. Tyto a další okolnosti vedly ke vzniku této knihy, která by měla lékařům pomoci při interpretování chování markerů v různých stádiích onemocnění. Kniha též obsahuje epidemiologické údaje o jednotlivých nádorech. Výsledek stanovení nádorových markerů se pak stává, vedle klinického obrazu a jeho historie, případných výsledků invazivních vyšetření atd., jednou z komponent, na jejichž základě se lékař rozhoduje.

### Diagnostické využití biomarkerů

#### *Rozdělení a obecná charakteristika biomarkerů*

Nádorové markery lze charakterizovat jako látky produkované maligními buňkami či organizmem jako odpověď na nádorové bujení. Může se jednat o antigeny lokalizované na povrchu buněčných membrán, obsažené v cytoplazmě, solubilní antigeny obsažené v biologických tekutinách, enzymy metabolických drah či fragmenty cytoplazmatických struktur uvolňované do okolí při zániku buněk. Celulární nádorové markery lze detekovat imunohistochemicky či v cytozolu nádorové buňky, humorální nádorové markery cirkulující v krvi či v jiných biologických tekutinách a lze je prokázat pomocí imunoanalytických metod. Přestože diagnostický práh nádorových markerů umožňuje v příznivých případech detekovat nádor o hmotnosti 1mg ( $10^6$  nádorových buněk), zatímco klinická diagnóza je určena většinou až u nádoru, který obsahuje asi  $10^9$  buněk, neexistuje dosud vzhledem k širokému spektru nádorových onemocnění univerzální nádorový marker.

Požadavky kladené na ideální nádorový marker jsou následující:

- je produkován pouze u maligních onemocnění
- je orgánově specifický
- vyskytuje se ve vysokých koncentracích v biologických tekutinách
- koreluje s velikostí nádoru
- koreluje se stádiem onemocnění
- koreluje s prognózou
- koreluje s účinností terapie

V klinické praxi neexistuje v současné době žádný nádorový marker, který by tato kritéria splňoval. Je proto nutné si vždy uvědomit optimální indikace a současně i limitace těchto vyšetření. Správně indikované vyšetření nádorových markerů může přispět především k včasnému zachytu recidivy či progresu onemocnění a tím i k rychlejšímu terapeutickému zákroku, který může prodloužit život nemocného. Orgánová specifita při vyšetřování nádorových markerů je nízká, a proto je nezbytně nutné jejich dynamické sledování v pravidelných intervalech.

Indikace vyšetření nádorových markerů u karcinomu tlustého střeva mají své limitace. Jedná

se o doplňkovou diagnostickou metodu. Pro správnou interpretaci výsledků je proto nezbytná nejen správná volba nádorových markerů, ale především způsob jejich klinického vyhodnocení, které vyžaduje úzkou interdisciplinární spolupráci mezi klinikem a laboratorním pracovníkem.

U nádorů tlustého střeva a konečníku je hlavním stanovovaným markerem karcinoembryonální antigen (CEA). Jako marker druhé volby je doporučován CA 19-9. Jako optimální se jeví kombinace těchto dvou markerů. K dalším markerům, které jsou studovány v souvislosti s kolorektálním karcinomem patří CA 72-4, dále pak další nádorové markery CA typu (CA 242, CA 195), markery cytokeratinu (TPA, TPS) a řada dalších. V přehledné Tabulce č. 5 jsme se zaměřili na nejčastěji vyšetřované nádorové markery v klinické praxi obecně.

Tabulka č. 5. Rozdělení nádorových biomarkerů podle funkce:

| Skupina markerů:                    |                                 | Jednotlivé markery.   |
|-------------------------------------|---------------------------------|---|
| Onkofetální a mucinózní antigeny    | Mající funkci u plodu           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• CEA</li> <li>• AFP</li> <li>• hCG</li> <li>• SP1</li> </ul>  |
|                                     | Karbohydrátové(cancer) antigeny | <ul style="list-style-type: none"> <li>• CA 125</li> <li>• CA 15-3</li> <li>• CA 19-9</li> <li>• CA 50</li> <li>• CA 72-4</li> </ul>  |
| Cytokeratinové nádorové markery     |                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• TPA</li> <li>• TPS</li> <li>• CYFRA 21.1</li> <li>• SCC</li> </ul>   |
| Enzymy                              | Proliferační                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Neuronspecifická enoláza</li> <li>• Thymidinkináza</li> </ul>  |
|                                     | Ostatní                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Prostatický specifický antigen</li> <li>• Kyselá prostatická fosfatáza</li> <li>• Laktátdehydrogenáza</li> </ul>                       |
| Hormony                             | Ektopická sekrece               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Adrenokortikotropní hormon</li> <li>• Antidiuretický hormon</li> <li>• Kortizon</li> <li>• Parathormon</li> <li>• Prolaktin</li> </ul> |
|                                     | Produkované nádorem             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Placentární laktogen</li> <li>• Kalcitonin</li> <li>• Parathormon</li> <li>• Prolaktin</li> </ul>                                      |
| Receptory                           |                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estrogenové</li> <li>• Progesteronové</li> </ul>   |
| Ostatní blíže nespecifikované látky |                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Feritin</li> <li>• <math>\beta_2</math>-mikroglobulin</li> <li>• Imunoglobuliny</li> </ul>   |

Většina nádorových markerů patří mezi **onkofetální antigeny**. Jde o látky, které nacházíme v poměrně vysokých koncentracích u plodu, kde se vyskytují na povrchu diferencujících se buněk (diferenciační antigeny) a hrají významnou roli ve vývoji plodu. U zdravých dospělých osob je jejich hladina velice nízká a přesná biologická funkce není známa. Při většině nádorových onemocnění se jejich aktivita výrazně zvyšuje. Typické pro ně je, že se vyskytují především u dobře diferencovaných nádorů a jejich hladina většinou koreluje s velikostí nádorové masy. Jejich stanovení má význam zejména pro určení prognózy nádorového onemocnění a kontrolu terapie.

**Cytokeratinové** nádorové markery jsou markery vzniklé narušením nebo nekontrolovaným růstem cytoskeletu buňky. Vyskytují se jako o cirkulující fragmenty nebo komplexy fragmentů cytokeratinů 8, 18, 19 normálního epitelu. Souvisejí výrazně s buněčnou proliferací a mnozí autoři je řadí mezi proliferační nádorové markery.

**Enzymatické** nádorové markery jsou po onkofetálních antigenech druhým nejčastěji užívanou skupinou nádorových markerů. Můžeme je rozdělit na dvě podskupiny. První podskupinu tvoří enzymy mající biologickou funkci především při buněčném dělení, (např. thymidinkináza a neuron-specifická enoláza). Tyto markery jsou značně zvýšené u všech stavů charakterizovaných především výraznou buněčnou proliferací. Proto se uplatňují při určování prognózy a stadia onemocnění. Markery druhé podskupiny jsou enzymy, které se vyskytují i ve zdravých tkáních, kde plní své biologické funkce. Tyto markery jsou vysoce orgánově či tkáňově specifické, ale neposkytují jakoukoliv informaci o typu poškození daného orgánu či tkáně. Dají se použít k určení primární lokalizace nádoru.

Dalším typem nádorových markerů jsou **hormony**. Jsou produkovány buď přímo samotnými endokrinními buňkami (např. kalcitonin medulárním karcinomem štítné žlázy nebo tyreoglobulin při typu folikulárním) nebo jsou produkovány ektopicky (např. látka podobná ACTH nebo hCG při bronchogenním karcinomu). Tyto nádorové markery jsou nejčastěji využívány ke kontrole efektu ať již operační či medikamentózní léčby.

U nádorů hormonálně aktivních se stanovují i počty **receptorů**. Na rozdíl od předchozích markerů, které se převážně stanovují v séru, jde o markery tkáňové, které se stanovují v bioptickém materiálu. Mají jednak význam pro určení prognózy nádoru, ale rozhodující význam mají pro volbu a kontrolu terapie (jako např. u nádorů prsu).

Poslední skupinu nádorových markerů tvoří nejrůznější tkáněmi produkované **blíže nespecifikované látky**, které se nedají zařadit do žádné z předchozích skupin, ale při nádorovém bujení se jejich hladiny v krvi zvyšují jako nespecifická reakce organismu na přítomnost nádorového onemocnění (ferritin,  $\beta_2$ -mikroglobulin, imunoglobuliny).

## Charakteristika vybraných biomarkerů

*CEA (karcinoembryonální antigen)*

**Charakteristika :** CEA je směsí 36 glykoproteinů s molekulovou hmotností mezi 150 - 300 kDa, které jsou z 55 % tvořeny sacharidy a ze 45 % bílkoviny. Vysoká heterogenita molekuly je dána heterogenitou sacharidové složky, proteinová složka je konstantní. Až dosud je známo 16 kódujících genů.

**Výskyt :** CEA je onkofetální bílkovinou, kterou lze prokázat na povrchu membrán

epitelových buněk především trávicího ústrojí a bronchů. V prvním trimestru je obsažen v buněčné cytoplazmě. V pozdějších fázích vývoje plodu je součástí povrchu buněčných membrán. U dospělých je produkován jen ve velice omezené míře epiteliálními buňkami bronchů, prsní žlázy a trávicího ústrojí. V minimálních koncentracích se CEA vyskytuje v krvi, pleurálním výpotku, ascitu a mozkomíšním moku. Nejvyšší koncentrace jsou ve vývodech slinných žláz. CEA je především metabolizován v játrech a vylučován ledvinami.

**Tabulka č. 6. Zvýšené hodnoty CEA:**

| <b>Maligní onemocnění</b>   | <b>Benigní onemocnění</b>   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Trávicího ústrojí <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Ca žaludku</li> <li>○ Ca tračnicku</li> <li>○ Ca rekta</li> <li>○ Ca plic</li> </ul> </li> <li>• Gynekologických nádorech <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Ca prsu</li> <li>○ Ca vaječnicků</li> <li>○ Ca dělohy</li> </ul> </li> <li>• Ca prostaty</li> <li>• Ca štítné žlázy</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• u kuřáků ( do 5 ng/ml)</li> <li>• při chronickém ledvinovém selhán</li> <li>• benigních onemocněních GIT a jater</li> <li>• ulcerózní kolitida</li> <li>• Crohnova choroba</li> <li>• Střevní polypóza</li> <li>• chronické hepatitidě</li> <li>• jaterní cirhóza</li> <li>• chronická pankreatitida</li> <li>• Zánětlivá onemocnění plic</li> <li>• bronchopneumonie</li> <li>• chronická bronchitida</li> <li>• TBC plic</li> <li>• Mukoviscidóza</li> <li>• Autoimunitní choroby</li> <li>• Benigních adenomech prsu</li> </ul> |

**Tabulka č.7. Referenční hodnoty CEA:**

|                     | <b>Hodnoty:</b> | <b>Jednotky:</b> |
|---------------------|-----------------|------------------|
| Normální hodnoty:   | 0 – 3           | ng/ml            |
| Hraniční hodnoty    | 3 - 5           | ng/ml            |
| Patologické hodnoty | > 5             | ng/ml            |

## Nádorové markery mucinózní

### CA 19-9

**Charakteristika :** CA 19-9 je monoklonální protilátkou definovaný mucin-sialo-glykolipid s molekulovou hmotností více než 1000 kDa s 10 % sacharidů. Patří mezi onkofetální nádorové markery.

**Výskyt :** Výskyt CA 19-9 úzce souvisí s Lewis(a) determinantou krevní skupiny. U vzácně se vyskytující Lewis(a-/b-) skupiny není tento nádorový marker produkován.

U plodu se vyskytuje v epitelových buňkách, především trávicího ústrojí, pankreatu a jater. U dospělých je produkován jen ve velice omezené míře epiteliálními buňkami bronchů a trávicího ústrojí. V minimálních koncentracích se vyskytuje v krvi, pleurálním výpotku, ascitu a mozkomíšním moku. CA 19-9 se eliminuje výhradně žlučí. U málo diferencovaných karcinomů se jeho produkce snižuje a v anaplastických chybí úplně.

Tabulka č.8. Zvýšené hodnoty CA 19-9:

| Maligní onemocnění   | Benigní onemocnění   |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Karcinomy trávicího ústrojí<ul style="list-style-type: none"><li>○ Ca pankreatu</li><li>○ Ca žlučníku a žlučových cest</li><li>○ primární Ca jater</li><li>○ Ca žaludku</li><li>○ kolorektální karcinom</li></ul></li><li>• Ca prsu</li><li>• Ca ovarií (především mucinózního typu)</li><li>• Ca dělohy</li><li>• Metastázy výše uvedených karcinomů do jater</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Onemocnění jater a žlučových cest<ul style="list-style-type: none"><li>○ cirhóza jater</li><li>○ primární biliární cirhóza</li><li>○ akutní hepatitida</li><li>○ toxická hepatitida</li><li>○ chronická hepatitida</li><li>○ cholecystitida</li><li>○ cholangoitida</li><li>○ choledocholitiáza</li></ul></li><li>• Akutní a chronická pankreatitida</li><li>• Benigní onemocnění žaludku a střeva (především zánětlivá)</li></ul> |

Tabulka č. 9. Referenční hodnoty CA 19-9:

|                     | Hodnoty: | Jednotky: |
|---------------------|----------|-----------|
| Normální hodnoty:   | 0 – 30   | IU/ml     |
| Hraniční hodnoty    | 30 - 40  | IU/ml     |
| Patologické hodnoty | > 40     | IU/ml     |

# PSA

---

## Základní charakteristika

Prostatický specifický antigen (PSA) je glykoprotein s molekulovou hmotností 30-34kDa. Je to serinová proteáza, jejíž hlavní role je proteolýza a zkapalnění seminální tekutiny a usnadnění pohybu spermatozoí. Patří do skupiny kalikreinů. Je produkován především prostatou, pouze limitované množství přechází do tělních tekutin. Koncentrace volné, tj. nekomplexované formy PSA (fPSA) v séru, vztahovaná ke koncentraci PSA celkového, se liší pro benigní a maligní nádorové onemocnění prostaty.

PSA je přítomen v prostatické a seminální plazmě, ve zdravé, hyperplastické i maligní prostatické tkáni a v metastázách prostatického původu. PSA je rovněž produkován paraureterálními žlázkami a ve velmi nízkých koncentracích se vyskytuje i u žen. V séru je přítomen ve 3 hlavních formách- volný (fPSA), vázaný na  $\alpha$ 2-makroglobulin a na  $\alpha$ 1-antichymotrypsin. Komplex s  $\alpha$ 2-makroglobulinem je imunologicky neaktivní, ale další dvě formy jsou imunologicky detekovatelné.

## Chemická struktura

Prostatický specifický antigen (PSA) je glykoprotein s molekulovou hmotností 30-34kDa. Je to serinová proteáza.

## Tvorba, metabolismus, vylučování, funkce

Je produkován především prostatou. V séru je přítomen ve 3 hlavních formách- volný (fPSA), vázaný na  $\alpha$ 2-makroglobulin a na  $\alpha$ 1-antichymotrypsin.

## Biologický poločas

PSA- 2-3 dny

## Preanalytika

Materiál: sérum

Vliv materiálu: vadí hemolýza

Vliv denních a jiných cyklů:

Vzorky PSA musí být odebrány před manipulacemi s prostatou - digitální rektální vyšetření (DRE), masáž prostaty, transrektální ultrazvukové vyšetření (TRUS) a biopsie prostaty. Digitální rektální vyšetření může způsobit přechodné zvýšení sérových hladin PSA. V případě hraničního zvýšení bylo doporučeno opakované měření hladiny PSA. Hladinu zvyšuje i jízda na kole nebo na koni. Transrektální punkční biopsie jehlou také zapříčiní přetrvávající zvýšení hladiny PSA. Proto se mezi punkční biopsií jehlou a odběrem vzorku na měření PSA doporučuje šestitýdenní prodleva.

Vliv léků: inhibitory 5alfa reduktázy

Další vlivy: manipulace s prostatou

## Proliferativní nádorové markery

TK (thymidinkináza)

**Charakteristika:** Thymidinkináza katalyzuje přeměnu thymidinu na thymidinmonofosfát (TMP) za přítomnosti adenosintrifosfátu (ATP). TMP je převeden v několika krocích na trifosfát, který je zabudován do DNA. Protože lze do DNA zabudovat thymidin jen ve fosforylované formě, hraje thymidinkináza podstatnou roli při zpracování thymidinu v buňce. *De novo* syntéza thymidinfosfátu normálně probíhá za katalýzy thymidylátsyntetázy z deoxyuridinmonofosfátu za přítomnosti kyseliny listové a vitamínu B<sub>12</sub>. Thymidinkináza na



rozdíl od thymidylátsyntetázy používá jako substrát buď exogenní thymidin z potravy nebo endogenní thymidin uvolněný z odbourávacích reakcí. Je označována také jako "salvage enzyme" (záchranný enzym). TK je nespecifický nádorový marker schopný zachytit maligní růst v různých orgánech.

**Výskyt:** V eukaryotních buňkách se nacházejí dva izoenzymy thymidinkinázy, které se odlišují biochemicky a elektroforeticky. U zdravého dospělého jedince se nacházejí v séru jen nízké koncentrace TK 1, vyšší hodnoty se mohou vyskytnout u neoplastických onemocnění a některých virových infekcí.

Tabulka č. 10. Zvýšené hodnoty TK:

| Maligní onemocnění   | Benigní onemocnění   |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• hematologická maligní onemocnění</li> <li>• Při progresi následujících karcinomů <ul style="list-style-type: none"> <li>○ bronchogenní karcinom</li> <li>○ Ca prsu</li> <li>○ kolorektální karcinom</li> <li>○ Ca prostaty</li> <li>○ Ca testes</li> <li>○ Ca močového měchýře</li> <li>○ karcinomatóza serózních blan</li> </ul> </li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• virové infekce</li> <li>• psoriáza</li> <li>• TBC pleuritida</li> <li>• sarkoidóza</li> <li>• revmatická onemocnění</li> <li>• zánětlivá onemocnění plic a trávicího ústrojí</li> <li>• perniciózní a megaloblastické anémie</li> <li>• kolagenózy</li> </ul> |

Tabulka č. 11. Referenční hodnoty TK:

|                     | Hodnoty: | Jednotky: |
|---------------------|----------|-----------|
| Normální hodnoty:   | 0 – 5    | IU/l      |
| Hraniční hodnoty    | 5 – 10   | IU/l      |
| Patologické hodnoty | > 10     | IU/l      |

#### Fragmenty cytokeratinu

Jde o cirkulující komplexy fragmentů *cytokeratinů 8, 18, 19*, které se vyskytují jak v normálním epitelu (jednoduchý, žláznový, vývodový, přechodný apod. ) tak v nádorových buňkách odvozujiících se od tohoto epitelu (mléčná žláza, plíce, ovarium, střevo, trachea,

močový měchýř, pankreas, většina endokrinních žláz, prostata apod.). Jsou pak prokazovány protilátkami různě označovaných testů.

*Cytokeratiny* tvoří tzv. *intermediární filamenta* jsou součástí cytoskeletonu; jsou dva typy: cytokeratinů : typ I - kyselé cytokeratininy 9 – 19 a cytokeratiny a typ II neutrální a bazické 1 – 8. V buňkách jsou organizovány jako *heterodimery*. V procesu buněčného dělení je jejich zmnožení projevem proliferace buněk. U maligních nádorů v progresi (šíření do okolí, metastázy) dochází k proteolytickému odštěpování solubilních fragmentů, které se dostávají do krevního oběhu a jsou *tak markery nádorové proliferace*.

Tabulka č. 12. Reaktivita různých testů proti fragmentům cytokeratinu

| Test       | Fragment 8 | Fragment 18 | Dimer 8/19 | Fragment 19 |
|------------|------------|-------------|------------|-------------|
| TPA        | +++        | +           | +++        | +++         |
| TPS        | +          | +++         | +          | +           |
| TPA-M      | +          | +           | +++        | +++         |
| TPAcyk     | +          | +++         | +          | -           |
| CYFRA 21-1 | -          | -           | +++        | +++         |

#### TPA (tkáňový polypeptidický antigen)

**Charakteristika :** Tkáňový polypeptidický antigen příbuzný s fragmenty *cytokeratinu* 8, 18 a 19. Je tvořen normálními i nádorovými buňkami. K markantnímu zvýšení dochází při výrazném zvýšení proliferační aktivity. V těhotenství stoupá během gestace (k návratu k výchozím hodnotám dochází 5 dní po porodu); zvýšen též u zánětů.

**Výskyt :** Fyziologicky je TPA (společně s TPS) produkován trofoblastem placenty, a dále v játrech, plicích, střevě a ledvinách vyvíjejícího se plodu. U zdravých dospělých je možné oba markery zjistit v epiteliální výstelce vývodů mléčné žlázy, močového měchýře, v plicích a v orgánech trávicího traktu.

Tabulka č. 13. Zvýšené hodnoty TPA:

| Maligní onemocnění   | Benigní onemocnění  |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ca prsu</li> <li>• nádory orofaciální oblasti</li> <li>• Ca prostaty</li> <li>• Ca štítné žlázy</li> <li>• Ca plic nemalobuněčný</li> <li>• Ca ledvin</li> <li>• Ca močového měchýře</li> <li>• Ca ovarií</li> <li>• nádory varlat</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• hepatitida</li> <li>• jaterní cirhóza</li> <li>• diabetes mellitus</li> <li>• infekce respiračního traktu</li> <li>• benigní onemocnění prsu</li> <li>• benigní onemocnění trávicího ústrojí</li> <li>• pooperační stavy</li> <li>• revmatická onemocnění</li> </ul> |

Tabulka č. 14. Referenční hodnoty TPA:

|                     | Hodnoty:  | Jednotky: |
|---------------------|-----------|-----------|
| Normální hodnoty:   | 0 - 120   | IU/ml     |
| Hraniční hodnoty    | 120 - 140 | IU/ml     |
| Patologické hodnoty | > 140     | IU/ml     |

Pozn.: V dlouhodobých studiích je nutné dodržovat používání jednoho typu stanovení (TPA nebo TPS) vzhledem k odlišné specifitě protilátek.

*TPS (tkáňový polypeptidický specifický antigen)*

Tkáňový polypeptidový antigen - specifický; tvoří se v pozdní S-fázi a G2 fázi buněčného cyklu (uvolňuje se bezprostředně po mitóze). Na rozdíl od TPA je stanovován monoklonální protilátkou (M3) proti jednomu epitopu - CK 18.

Tabulka č. 15. Zvýšené hodnoty TPA:

| Maligní onemocnění   | Benigní onemocnění   |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ca prsu</li> <li>• Nádory orofaciální oblasti</li> <li>• Ca jater</li> <li>• Ca pankreatu</li> <li>• Nádory varlat a ca prostaty</li> <li>• Ca štítné žlázy</li> <li>• Ca plic</li> <li>• Ca ledvin</li> <li>• Ca ovarií</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hepatitida</li> <li>• Jaterní cirhóza</li> <li>• Diabetes mellitus</li> <li>• Infekce respiračního traktu</li> <li>• Benigní onemocnění prsu</li> <li>• Benigní onemocnění trávicího ústrojí</li> <li>• Pooperační stavy</li> <li>• Revmatická onemocnění</li> <li>• Imunoalterační onemocnění</li> </ul> |

Tabulka č. 16. Referenční hodnoty TPS:

|                     | Hodnoty: | Jednotky: |
|---------------------|----------|-----------|
| Normální hodnoty:   | 0 - 90   | IU/ml     |
| Hraniční hodnoty    | 90 - 120 | IU/ml     |
| Patologické hodnoty | > 120    | IU/ml     |

**Matrix metaloproteinázy:**

Jedná se o skupinu proteolytických enzymů, které působí svým proteolytickým účinkem na bazální membránu endotelií a extracelulární matrix. V současné době je klasifikováno přes 20 matrix metaloproteináz, přehled je uveden v Tab. č. 17.

*Tabulka č. 17. Přehled jednotlivých skupin matrix metaloproteináz*

| <b>Skupina</b>               | <b>Druh</b>               | <b>Zkratka</b> | <b>Molek. hmotn.</b> | <b>Primární substrát (místo působení)</b> |
|------------------------------|---------------------------|----------------|----------------------|---|
| <b>Kolagenázy</b>            | Intersticiální kolagenáza | MMP-1          | 52 kDa               | Kolagen typu I. - III., VII. VIII, X.     |
|                              | Neutrofilní kolagenáza    | MMP-8          | 75 kDa               |   |
|                              | Kolagenáza 3              | MMP-13         |                      |   |
| <b>Gelatinázy</b>            | Gelatináza A              | MMP-2          | 72 kDa               | Kolagen typu IV. - V.                     |
|                              | Gelatináza B              | MMP-9          | 92 kDa               |   |
| <b>Stromelysin</b>           | Stromelysin-1             | MMP-3          | 55 kDa               | Proteoglykany, laminin, fibronectin       |
|                              | Stromelysin-2             | MMP-10         | 55 kDa               | Kolagen IV. - V. typu                     |
|                              | Stromelysin-3             | MMP-11         | 61 kDa               | Serinové proteázy                         |
|                              | Metaloelastáza            | MMP-12         | 54 kDa               | Elastin                                   |
| <b>MMP membránového typu</b> | MT1-MMP                   | MMP-14         | ~ 63 kDa             | Progelatináza A                           |
|                              | MT2-MMP                   | MMP-15         |                      |   |
|                              | MT3-MMP                   | MMP-16         |                      |   |
|                              | MT4-MMP                   | MMP-17         |                      |   |
|                              | MT5-MMP                   | MMP-21         |                      |   |

Dříve byla úloha matrix metaloproteináz spojována pouze s degradací bazální membrány extracelulární matrix. V poslední době se ukazuje, že matrix metaloproteinázy mají v procesu růstu nádoru a metastazování mnohem komplexnější úlohu. Degradací bazálních membrán kompartmentových systémů ovlivňují nejen invazi nádoru do bezprostředního okolí, či intra a extravazaci nádorových buněk, ale ovlivňují také migraci buněk v místě tvorby vzdálených metastáz. Hrají též významnou úlohu v procesu angiogeneze a to vytvářením prostoru pro nově vznikající cévy, podporou

mobility endotelií a invazí buněk nádoru do cév. U pacientů s kolorektálním karcinomem byly patologické hodnoty proteináz MMP-1, MMP-2 a MMP-7 spjaty s výskytem metastáz, v případě MMP-1 korelovaly hodnoty s Duksovou klasifikací a stupněm postižení lymfatických uzlin. U pacientů se stadiem Dukes C a D se metaloproteinázy MMP-1 a MMP-7 jeví jako nezávislý prognostický faktor nepříznivé prognózy.

Antagonisticky proti proteolytickému účinku matrix metaloproteináz působí **inhibitory** matrix metaloproteináz TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase). Jejich účinek spočívá ve stabilizaci bazální membrány, která se pod vlivem TIMP stává intaktní vůči účinku proteolytických enzymů a znesnadňuje invazi nádorových buněk a endotelií. Význam intenzivního zkoumání těchto látek spočívá především v možnosti léčebné intervence, kdy stabilizace bazální membrány a inhibice proteolytických enzymů může mít zásadní význam v kauzální léčbě metastáz.

V současné době probíhá několik studií na možný význam stanovení metaloproteináz MMP-2, MMP-9 a jejich inhibitorů z hlediska možné včasné detekce metastatického procesu u pacientů s kolorektálním karcinomem. Kromě pilotních studií, které poukazují na možný klinický význam však doposud nejsou validní výsledky k dispozici.

Nyní je v popředí zájmu klinický výzkum využití těchto inhibitorů ve formě léků. V různých klinických studiích se nyní testuje okolo 20 různých přípravků, některé jsou již ve III. stádiu klinického vyhodnocení. Podrobně byly sledovány např. Bay 12-9566 (fa Bayer), BB94 (fa British Biotechnology), které mají stabilizační účinek na bazální membránu a zamezují tak možnému metastatickému procesu. Některé se dávají do kombinace s interferony, bevacizumabem či chemoterapií. <sup>(Raia 2005)</sup>

#### Adhezivní molekuly

Tato skupina zahrnuje asi 70 látek imunoglobulinového typu. Tyto molekuly mají zásadní význam nejen v celé řadě fyziologických procesů (embryogeneze, imunitní reakce, reparace poškozených tkání), ale uplatňují se i v celé řadě procesů patologických. V případě adheze agregátů nádorových buněk s krevními destičkami se uplatňují především selektin E, a dále imunoglobuliny ICAM-1, ICAM-2 a VCAM-1, které se v interakci s cytokiny podílejí na aktivaci endotelu a následné adhezi agregátů destiček a metastatických nádorových buněk k endotelu. Existuje nejméně 5 skupin adhezivních molekul, viz Tabulka č. 18.

Tabulka č. 18. Přehled jednotlivých skupin adhezivních molekul:

| Adhezivní molekuly    |  |
|-----------------------|--|
| Skupina               | Druh   |
| <b>Integriny</b>      | $\beta_1$ - $\beta_8$  |
| <b>Selektiny</b>      | E-selektin, P-selektin, L-selektin   |
| <b>Imunoglobuliny</b> | Intercellular adhesion molecules: ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3<br>Vascular cell adhesion molecules: VCAM-1 |
| <b>Kadheriny</b>      | E-kadherin, P-kadherin, N-kadherin   |
| <b>Ostatní</b>        | CD 22, CD 24, CD 44, CEA   |

V souvislosti s metastatickým procesem kolorektálního karcinomu v játrech připisují některé experimentální práce významnou úlohu onkofetálnímu antigenu CEA, který se spolu s antigenem NCA (non specific cross-reacting antigen) váže přes peptidovou sekvenci PELPK na receptory Kupfferových buněk v játrech, čímž je stimulována produkce cytokinů (IL-1 $\beta$ , IL6), regulačního peptidu TNF $\alpha$  a dalších působků, které působí aktivaci endotelu krevních jaterních kapilár, aktivaci adhezivních molekul (selektin E, VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2) a tím vlastní adhezi agregátů krevních destiček a metastatických nádorových buněk k jaternímu endotelu. Tyto závěry podporují výsledky některých pilotních studií, které popisují patologické hodnoty selektinu E, VCAM-1, ICAM-1 u pacientů s jaterními metastázami a to především v souvislosti s patologickými hodnotami CEA. V kombinaci s CEA se tedy jeví tyto adhezivní molekuly jako faktor časného záchytu jaterních metastáz.

#### Faktory regulující angiogenezi

Angiogeneze je proces, při kterém primitivní vaskulatura expanduje a nemodeluje se. Tím dochází k novotvorbě cév, které se mohou vzájemně propojovat a větvit, čímž dochází ke zralému cévnímu systému. Jedná se o vícestupňový proces (angiogenní kaskáda), který je regulován řadou faktorů. Za fyziologického stavu jsou faktory podporující angiogenezi v dynamické rovnováze s faktory, které ji potlačují (angiogenní a antiangiogenní faktory). Endotheliální buňky tedy samy o sobě pro novotvorbu cév nestačí a pro kompletní novotvorbu je nezbytná jejich součinnost s peri-endoteiálními buňkami a matricí. U dospělého jedince je angiogeneze vysoce potlačena a jen asi u 0,01 % endoteiálních buněk probíhá dělení. Většina nádorů u lidí perzistuje in situ po dlouhé měsíce až roky bez známek cévní novotvorby. Neovaskularizace začne, jakmile nádorové ložisko dosáhne velikosti 1-2 mm<sup>3</sup> (asi 10<sup>6</sup> buněk) a přívod kyslíku a živin prostou difúzí přestává pro výživu buněk a jejich dělení stačit. Limitace zásobení živinami udržuje rovnovážné tempo mezi replikujícími a zanikajícími buňkami, kdy je po určité době proliferace v rovnováze s apoptózou. Hypoxický nádor je však geneticky nestabilní, vznikají v něm četné mutace (např. mutace genu p 53, která vede k potlačení produkce antiangiogenního trombospondinu). Objevuje se nový fenotyp se zvýšenou produkcí VEGF a dalších angiogenních faktorů (tzv. TAF-tumor angiogenesis factors). Tato změna je označovaná též jako „angiogenní switch“. Angiogenní zvrát zahrnuje změnu lokální rovnováhy mezi stimulatory a inhibitory růstu mikrocév. Nádorové buňky mohou vytvářet zvýšené množství jednoho či více stimulatorů, mobilizovat angiogenní faktory z extracelulární matrice, či stimulují k jejich produkci buňky hostitelského organismu jako např. makrofágy, či se jedná o kombinace těchto různých vlivů. Mezi

nejčastěji prokázané stimulatory patří bFGF a VEGF, ale v nádorových tkáních byla prokázána celá řada dalších faktorů. Nadprodukce angiogenních faktorů není však dostačující, musí rovněž dojít k supresi inhibitorů, které za normálních okolností brání endotel před mitogenními stimuly. Proliferace je rovněž regulována pericyty (produkce mitogenů, či snížení senzitivity k růstovým faktorům).

Na buněčné úrovni neovaskularizace dochází ke stimulaci nádorového růstu díky zvýšené perfúzi a parakrinním působkům, jako je produkce růstových faktorů (bFGF, IGFs, PDGF, granulocyte colony-stimulating factor) či jejich uvolněním z buněk hostitele a dopravením do nádorové tkáně.

Tabulka č. 19. Přehled angiogenních a antiangiogenních faktorů

| <b>Angiogenní faktory</b>                     |  |
|---|--|
| <b>Faktor</b>                                 | <b>Mechanismus účinku</b>  |
| MMP (Metaloproteinázy)                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteolýza bazální membrány a extra-celulární matrix</li> </ul>   |
| TNF alfa                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aktivace MMP</li> </ul>   |
| Angiopoetiny                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibice exprese adhezivních molekul</li> </ul>   |
| FGF beta (fibroblast growth factor)           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibice proliferace a migrace endotelových buněk</li> <li>• Stimulace tvorby inhibitorů proteáz</li> </ul> |
| VEGF (vaskulární endotelový růstový faktor)   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Zvýšení permeability</li> <li>• Navození proliferace endotelu</li> </ul>                                    |
| EGF (epidermal growth factor)                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Stimulace výdeje VEGF</li> </ul>  |
| PDGF (Růst. f. odvozený od trombocytů)        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Stimulace proliferace fibroblastů</li> <li>• Stimulace tvorby kolagenu</li> </ul>                           |
| PAI – 1 (Inhibitor plasminového aktivátoru 1) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Stabilizace matrix kolem nových cév</li> </ul>  |
| <b>Antiangiogenní faktory</b>                 |  |
| <b>Faktor</b>                                 | <b>Mechanismus účinku</b>  |
| FGF beta (fibroblast growth factor)           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibice proliferace a migrace endotelových buněk</li> <li>• Stimulace tvorby inhibitorů proteáz</li> </ul> |
| Trombospodin                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Univerzální inhibice angiogeneze</li> </ul>   |
| TGF- beta                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibice proliferace</li> <li>• Zvýšení tvorby thrombospodinu</li> </ul>                                    |
| Angiostatin                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibice proliferace endotelií</li> </ul>   |
| PF-4 (platelet factor 4)                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibice proliferace endotelií</li> </ul>   |
| Interferon alfa, beta                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibice proliferace endotelií</li> </ul>   |
| Antiangiogenní interleukiny (IL-12, IL-18)    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibice migrace endotelií</li> </ul>   |
| Endostatin                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Indukce apoptózy endotelií</li> </ul>   |

Z klinického pohledu neovaskularizace umožňuje nádoru růst a metastazování, což často vede ke klinické symptomatologii nádorového onemocnění. Většinou nádory začínají být klinicky zřejmé až po angiogenním zvratu, ale to rovněž neznamená, že to povede k rychle rostoucímu nádoru. Za určitých okolností mohou být také vzdálené metastázy suprimovány cirkulujícími inhibitory z primárního ložiska a začnou růst až po jeho odstranění. Paradoxně, neovaskularizace snižuje schopnost průniku chemoterapeutik do nádoru. Zatímco nádory menší než 1 cm (v počátečním stadiu neovaskularizace) jsou dobře prokrveny, větší nádory jsou díky útlaku cév prokrveny hůře. Útlak je způsoben zvýšeným intersticiálním tlakem při zvýšené permeabilitě nově tvořených cév a sníženým počtem lymfatické drenáže, což vede často k centrálním nekrotickým. Proto také není překvapující, že antiangiogenní látky snížením intranádorového tlaku zlepšují dostupnost chemoterapie.

Novotvorba cév je tedy procesem, bez kterého nemůže organismus přežít, ale je i základní podmínkou přežití a další progresu a metastazování nádorového onemocnění. Jedná se o komplexní proces řízený celou řadou faktorů a pouze jeden z biologických rysů nádorového onemocnění.

Z předchozího výkladu vyplývá, že existuje úzký vztah mezi angiogenezi a tvorbou metastáz. Čím je angiogeneze intenzivnější, tím je riziko metastáz větší a prognóza nádorového onemocnění horší. I v případě kolorektálního karcinomu bylo prokázáno, že intenzita angiogeneze v marginálním okraji nádoru koreluje s prognózou nádorového onemocnění.

Z angiogenních faktorů je nejintenzivněji studován endoteliální růstový faktor VEGF. Sérové hodnoty VEGF korelují u pacientů s kolorektálním karcinomem s nepříznivou prognózou a tato korelace je nezávislá na výskytu distančních metastáz<sup>(Dirix, 1999)</sup>. Nepodařilo se prokázat, že se jedná o nezávislý prognostický faktor. Z dalších prováděných studií publikoval Shimoyama a kol.<sup>(Shimoyama 1999)</sup> signifikantně vyšší hodnoty angiogeninu u pacientů s kolorektálním karcinomem ve stadiu Dukes C ve srovnání se skupinou pacientů ve stadiu Dukes A. Sérové hodnoty signifikantně korelovaly s histologickým průkazem angiogeninu v nádorové tkáni. Různé mechanismy inhibice angiogeneze mohou být v budoucnu přínosem v terapii nádorového onemocnění a výsledky prvních klinických studií jsou povzbudivé. Dle místa účinku se jedná o tři hlavní skupiny terapeutik:

- Inhibitory stimulátorů a přirození antagonisté angiogeneze
- Inhibitory endoteliální proliferace a migrace
- Stabilizátory bazální membrány

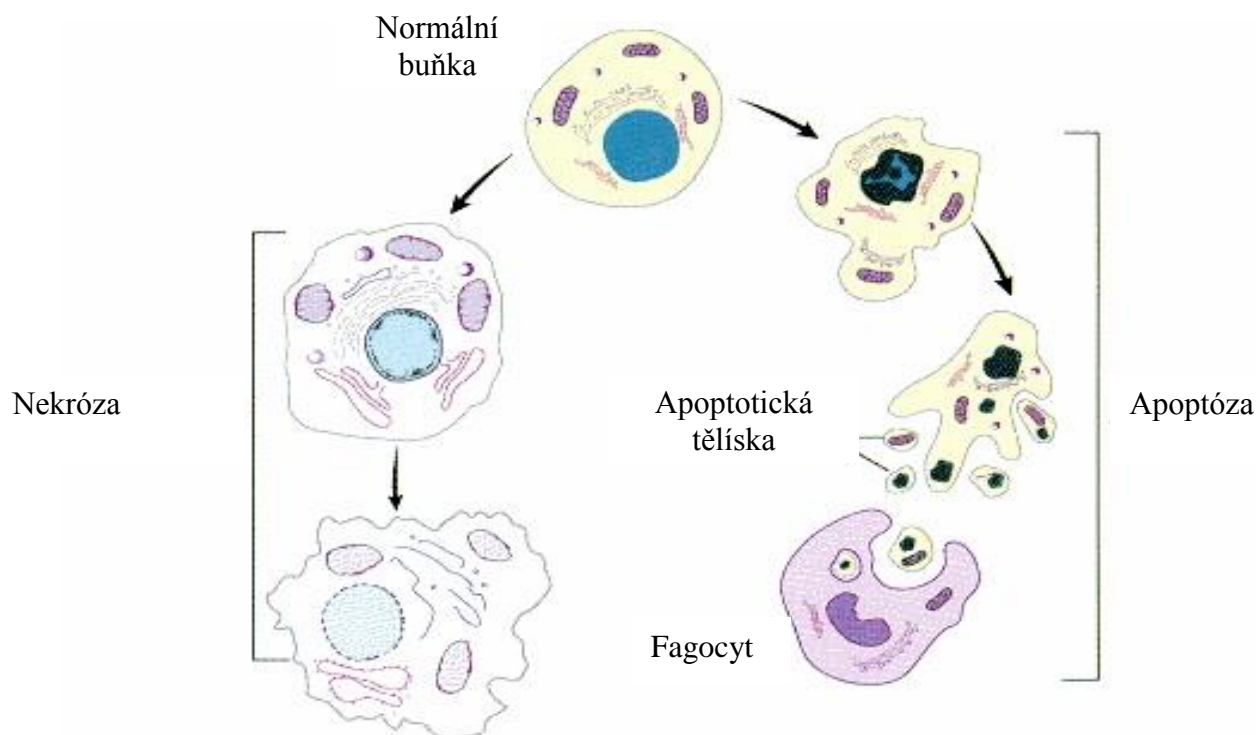
#### Faktory apoptózy

Růst nádorových buněk je podmíněn nejen nekontrolovatelným buněčným dělením, ale také zvýšenou schopností přežít. Většina nádorových buněk získala rezistenci vůči mechanismům vedoucím k jejich programovanému zániku – apoptóze. Narušení signalizace apoptózy je obecným předpokladem existence a rozvoje nádorových buněk. Velmi důležitou úlohu při tomto procesu má pravděpodobně onkogenní potenciál faktoru Bcl2 (B-cell lymphoma gen). Jeho nadměrná exprese má vliv na narušení apoptózy. Tímto mechanismem mají neoplastické buňky selekční výhodu, mohou setrvávat jako ložiska v hostitelské tkáni ochráněné před apoptózou.



Je nutné velice důsledně rozlišovat mezi dvěma ději – nekrózou a apoptózou. *Nekróza* je patologický proces, kdy dochází k nekontrolovanému, náhlému a chaotickému zániku buněk. Dochází při ní k dilataci endoplasmatického retikula, alteraci mitochondrií, zduření buňky a následně k ruptuře plazmatické membrány. Tím dochází k definitivnímu zániku buňky. *Apoptóza* je fyziologický proces, kdy dochází ke kondenzaci chromatinu, segmentaci jádra, postupnou tvorbou apoptotických tělísek, které obsahují části cytoplasmy i fragmenty jádra. Tato tělíška jsou postupně fagocytována makrofágy a jinými fagocytujícími buňkami. Rozdíl vyplývá z obrázku č. 8:

Obrázek č. 8. Schéma apoptózy (Masopust 2003)



### 1.1.1.1. Metody stanovení parametrů biologické aktivity

Parametry biologické aktivity lze detekovat jednak imunohistochemicky či v cytosolu nádorové buňky (celulární markery) nebo cirkulují v krvi či jiných tělních tekutinách (humorální markery) a stanovují se zpravidla pomocí metod imunoanalytické analýzy. Tyto metody získávají postupem času stále větší popularitu. Od čistě klinického použití se dnes rozšiřují do mnoha dalších oblastí, kde je vyžadováno specifické, rychlé a levné stanovení určité látky v přítomnosti dalších komponent.

Tabulka č. 20. Přehled imunoanalytických metod používaných k detekci parametrů biologické aktivity u kolorektálního karcinomu.

| Typ metody:   | Specifický název metody:               | Výrobce           | Parametr                      |
|---|--|-------------------|-------------------------------|
| <b>RIA</b><br>(Radioimunoanalýza)                           | IRMA<br>(Imunoradiometrická analýza)   | IDL Biotech<br>AB | TPA<br>TPS<br>MonoTotal       |
|   |  | Immunotech        | CEA<br>CA 19-9                |
|   | REA<br>(Radioenzymová analýza)         | Immunotech        | TK                            |
| <b>EIA</b><br>(Enzymoimunoanalýza)                          | ELISA                                  | CanAg             | CEA<br>CA 19-9<br>CA 242      |
|   |  | Biomedica         | ICAM<br>V-CAM 1<br>E-selektin |
|   |  | IDL Biotech<br>AB | TPS<br>TPA                    |
|   | MEIA<br>(Mikročástečková imunoanalýza) | Abbott            | CEA<br>CA 19-9                |
| <b>CMIA</b><br>(Chemoluminiscenční magnetická imunoanalýza) | Chemiluminiscence                      | Beckman           | CEA<br>CA 19-9                |
|   |  | Roche             | CEA<br>CA 19-9                |

F.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

**Univerzita Karlova Praha  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI**

## **PRINCIP A VYUŽITÍ IMUNOANALYTICKÝCH METOD**

**Autoři:**

**Marie Karlíková, Radek Kučera, Judita Kinkorová,  
Ondřej Topolčan a kolektiv**

**Editor:**

**Doc. RNDr. Judita Kinkorová, Ph.D.**

*Sponsored by OP VK CZ.1.07/2.3.00/20.0040*

---

**Autoři:**

***RNDr. Marie Karlíková, Ph.D.***

***PharmDr. Radek Kučera, Ph.D.***

***Doc. RNDr. Judita Kinkorová, Ph.D.***

***Prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.***

***MUDr. Miroslava Čásová***

***MUDr. Šárka Svobodová, Ph.D.***

***RNDr. Martin Pešta, Ph.D.***

***RNDr. Jindra Windrichová, Ph.D.***

***Filip Janků***

***MUDr. Jiří Polívka sen., CSc.***

***Ing. Jiří Polívka***

***Doc. MUDr. Juraj Kaušitz***

## PRINCIP IMUNOANALÝZY

Imunochemické reakce protilátka-antigen je základním principem všech imunoanalytických metod, které slouží ke kvantifikaci látek v biologických tekutinách.

*In vivo* je reakce protilátka-antigen základním obranným mechanismem proti infekci tj. při každé imunitní odpovědi organismu. Reakce *in vitro* je využívána analytických metodách, kterým je věnována tato publikace a které byly objeveny Bersonem a Yelovovou v roce 1957.

Při reakci **antigen (Ag) –protilátka (Ab)** vzniká **–imunokomplex (AgAb)**.



Extrémní citlivost imunoanalytických metod (detekční limity dosahují hodnot  $10^{-15}$  až  $10^{-20}$  mol.L<sup>-1</sup>, což v praxi znamená koncentraci jedné molekuly na litr) souvisí s přirozenými vlastnostmi protilátek :

- 1) schopností **vázat se na velké množství** analytů majících antigenní charakter.
- 2) **specifitou** pro reagující látku, tj. schopnost vázat se právě na tuto látku za přítomnosti dalších sloučenin.
- 3) **silou vazby** protilátky s antigenem.

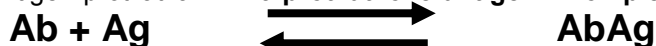
Pro detekci a kvantitativní vyjádření výsledku je nezbytné, aby jedna z látek v reakci (protilátka, nebo antigen) byl značen indikátorem, který je možno jednoduše měřit s vysokou přesností a reprodukovatelností. Indikátorem může být radioaktivní izotop (radioizotopové metody) nebo jiné látka: enzym, fluorescenční látka, DNA, koloidní částice apod. (neradioizotopové metody).

Moderní imunoanalytické metody jsou snadno proveditelné a dobře automatizovatelné. Uplatňují se v mnoha odvětvích medicíny a to jak v rutinní praxi tak ve Umožňují stanovení látek s velmi nízkou koncentrací, např. hormonů, nádorových markerů, enzymů, interleukinů atd.

### Reakce protilátka-antigen

K reakci protilátka-antigen *in vivo* dochází při imunitní odpovědi organismu. Reakce *in vitro* je využívána v imunoanalytických laboratorních stanoveních.

Při reakci antigen-protilátka vzniká **protilátkově-antigenní komplex imunokomplex**).



Reakce je reverzibilní. O pevnosti vazby rozhoduje rovnovážná konstanta; obecně je vazba protilátka-antigen **silná**, takže je stabilní i během separačních a dalších procesů.

Reakce je **specifická**, tj. protilátka je schopná specificky vázat určitý antigen i za přítomnosti dalších sloučenin v mnohonásobně vyšší koncentraci. Obecně lze imunoanalytické metody zařadit mezi analytické postupy založené na specifické reakci ligandu (L) a vhodného vazebného reagens (VR) za vzniku komplexu (L-VR).



Odtud plyne nejobecnější označení těchto metod jako metody "ligandové analýzy".

# Základní substance imunoanalýzy

## Protilátky

Protilátky (angl. *antibody*, Ab) jsou většinou glykoproteiny, produkované vyššími živočichy v rámci imunitní odpovědi organismu proto také jejich označení imunoglobuliny. V imunoanalýze jsou nejdůležitější komponentou reakce; především na jejich vlastnostech závisí výsledek imunoanalytického stanovení.

Ke stanovení žádané molekuly (**analytu**) se využívá jedna nebo několik různých protilátek. Analytem může být látka, která je přirozenou součástí organismu (např. hormony štítné žlázy) nebo je v těle produkována, ale typicky přítomna není (např. tumorové markery), nebo látky, které se v těle přirozeně nevyskytují (léky, drogy apod.).

**Specifitu** protilátky pro určitou **antigenní determinantu** –, určují sekvence aminokyselin na lehkých řetězcích molekuly protilátky **jsou antigenní determinantou** epitopem.

Pro správnou charakteristiku protilátky je nutná znalost interferenci s jinými látkami, než je látka, pro jejíž stanovení je protilátka určena. Hovoří se procentu zkřížené reakce s interferující látkou. Kromě specifity charakterizují protilátku valence, afinita a avidita

**Valence protilátky** je **počet vazebných míst** na její molekule, která jsou schopna reagovat s determinantami určitého antigenu;. Protilátky tedy jsou buď **monovalentní** (obsahují jedno vazebné místo), nebo **polyvalentní** (obsahují více vazebných míst).

**Afinita** je **energie vazby protilátky** s jednou antigenní determinantou. Je vyjádřena pomocí **asociační konstanty** ( $K_{as}$ ) reakce. Kvalitní protilátky používané pro účely imunoanalýzy by měly mít  $K_{as} = 10^{10} - 10^{12} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

**Avidita** je **energie vazby mezi molekulou antigenu a protilátkou**. Avidita je závislá na **afinitě, ale bere v úvahu valenci antigenu a protilátky i nespecifické faktory, které ovlivňují vazby mezi antigenem a protilátkou**.

**Podle způsobu přípravy dělíme protilátky do dvou základních skupin, na:**

- protilátky **polyklonální**,
- protilátky **monoklonální**.

## Polyklonální protilátky

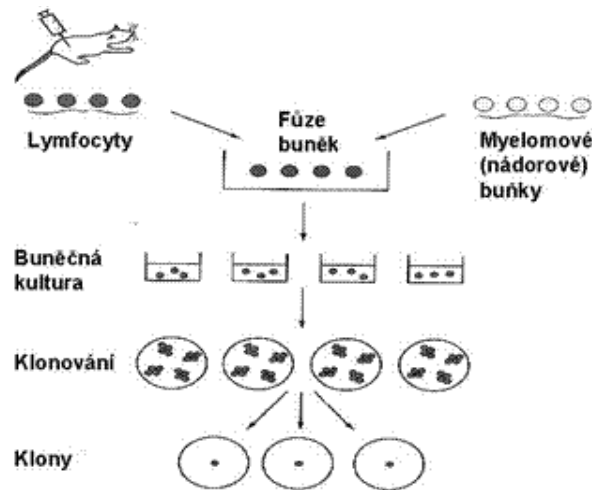
Připravují se cílenou imunizací zvířat. Zvířeti se aplikuje antigen v emulzi s tzv. "Freundovým adjuvans" (směs minerálních olejů, vosků a neživých bakterií, která zvyšuje imunitní reakci na podaný antigen). Doba imunizace, která je potřebná k tvorbě protilátek, je pro jednotlivé antigeny různá (2 až 6 měsíců). Během imunizace vzniká v krvi zvířete směs protilátek proti různým antigenním determinantám použitého antigenu.

Podle toho zda k imunizaci byl použit jeden antigen (např. jedna bílkovina), vytvářejí se **monospecifické protilátky**. Použití směsí antigenů vede k vzniku produkci **polyspecifických protilátek**. Polyklonální protilátka může reagovat **s několika antigenními determinantami**. Polyklonální protilátka je **nereprodukovatelná**,

## Monoklonální protilátky

Za „teorie pojednávají o specifitě ve vývoji a kontrole imunitního systému a za objev principu produkce monoklonálních protilátek“. G. Köhler a C. Milstein, a N. K. Jern v roce 1984 získali Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu, Monoklonální protilátky nejsou produkovány přímo organismem, ale buněčnou kulturou viz schéma přípravy.

Obr. 1: Příprava monoklonálních protilátek. (Zdroj: Zichová et al. 1993):



Prvním krokem je imunizace myši příslušným antigenem a následně se z její sleziny získají lymfocyty produkující protilátky. Druhým krokem je jejich hybridizace s myelomovými (nádorovými) buňkami, kdy dojde k fúzi obou typů buněk (ke splynutí jader myelomové buňky a lymfocytu) a vytvoření tzv. hybridomů. Geny imunizovaného zvířete ("lymfoidního rodiče"). Zajišťují, že syntéza protilátky pokračuje v hybridomu, "Myelomovému rodiči" dává hybridom "nesmrtelnost", může se množit bez omezení po mnoho generací. Optimální selekcí hybridomů (tzv. klonováním), lze pak vybrat ty klony, které produkují protilátky proti požadované antigenní determinantě antigenu. Protilátka syntetizovaná hybridomem je **homogenní**, s jediným typem vazebného místa, je produktem jednoho klonu lymfocytů. Hybridomy lze uchovávat za určitých podmínek (např. zmrazením na nízkou teplotu) a použít pro další produkci protilátek.

Monoklonální protilátka tedy rozeznává jedinou antigenní determinantu, její příprava je, na rozdíl od polyklonálních protilátek **reprodukovatelná**.

Monoklonální protilátky (zpravidla myši) jsou využívány nejen v imunoanalýze, ale jako látky pro zobrazovací techniky nebo i pro léčbu. Aplikace monoklonálních protilátek však u pacientů může vyvolat imunitní odpověď - produkci anti-myších neboli **protilátek HAMA** (Human-Anti-Mouse-Antibodies), která vede k falešně pozitivním, případně falešně negativním výsledkům u imunoanalytických stanovení.

## Jaký typ protilátek pro imunoanalýzu?

Shrnutí nejdůležitějších vlastností polyklonálních a monoklonálních protilátek s ohledem na jejich využití v imunoanalýze je uvedeno v tabulce

|                                 | Polyklonální protilátky | Monoklonální protilátky |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Specifita                       | +                       | +++                     |
| Afinita                         | +++                     | ++                      |
| Avidita                         | +++                     | ++                      |
| Reprodukovatelnost přípravy     | Ne                      | ano                     |
| Množství připravené protilátky  | Omezené                 | neomezené               |
| (Počáteční) náklady na přípravu | Nízké                   | vysoké                  |

|                                  |          |     |
|----------------------------------|----------|-----|
| Počet epitopů, které rozeznávají | 2 a více | 1   |
| Zkřížené reakce                  | Ano      | ne  |
| Možnost interference HAMA        | ne       | ano |
| Reprodukovatelnost výsledků      | +        | +++ |
| Citlivost                        | +++      | +++ |

## Antigen

**Antigeny** jsou makromolekulární látky přirozeného nebo syntetického původu, které imunitní systém rozeznává jako cizí. Jejich přítomnost v organismu stimuluje tvorbu protilátek, resp. navozuje imunitní odpověď. Antigeny v imunoanalýze jsou jednak látkou kterou měříme, jednak látkou sloužící k přípravě protilátek a konečně i látkou umožňující kvantitativní stanovení. Následující odstavce se týkají charakteristiky antigenu jako imunogenu.

Vzhledem ke své reakci může být antigen

- kompletní – **imunogen** (např. růstový hormon, inzulin), nebo
- nekompletní – **hapten** -, z něhož pomocí vazby s makromolekulárním nosičem vznikne imunogen. Příkladem jsou steroidní hormony.

**Imunogen** je charakterizován dvěma vlastnostmi. Jsou to:

- **imunogenicita**, neboli schopnost navodit imunitní odpověď (tvorba protilátek, zapojení regulačních a výkonných lymfocytů), a
- **specifita**, tj. schopnost s těmito lymfocyty a protilátkami reagovat. Imunogen reaguje jen s těmi lymfocyty a protilátkami, jejichž tvorbu vyvolal.

Každý imunogen se skládá z makromolekulárního nosiče a nízkomolekulárních determinantních skupin, tzv. antigenních determinant neboli **epitopů**. Antigenní determinanta je tvořena 5-8 aminokyselinami nebo monosacharidovými jednotkami, které se strukturálně nacházejí blízko u sebe. Různé antigeny obsahují různé antigenní determinanty a změna jedné aminokyseliny nebo monosacharidu dává vznik protilátce se zcela odlišnými vlastnostmi. Schopnost protilátek rozlišovat i malé rozdíly epitopů je základem specifity imunitních reakcí.

Imunogen musí splňovat určité fyzikální, chemické a biologické vlastnosti.

Z fyzikálních vlastností je to zejména

- relativní molekulová hmotnost > 10 000,
- rozpustnost
- elektrický náboj.
- tvar molekuly (konformační struktura)
- dostupnost epitopů.

Z chemického hlediska mohou být imunogeny prakticky všechny biopolymery nacházející se v živých systémech stejně jako řada syntetických antigenů. K nejsilnějším imunogenům se řadí proteiny, následují polysacharidy. Čisté lipidy tvoří často pouze hapteny, jejich imunogenicita stoupá vazbou s proteiny nebo polysacharidy.

Z biologických vlastností je třeba zmínit především **genetickou vzdálenost**. Čím větší bude rozdíl mezi zdrojem antigenu a příjemcem, tím větší bude jeho imunogenicita.

Míra imunitní odpovědi na podaný antigen závisí na dávce a způsobu podání. Stejně množství antigenu, které je neúčinné při intravenózním podání, může vyvolat výraznou odpověď, je-li podáno subkutánně. Vzrůstající dávky vedou k vyšší imunitní odpovědi, nejsou

však přímo úměrné zvýšené dávce imunogenu. Vzrůstající dávky mohou za určitých okolností stimulaci tvorby protilátek nejen snížit, ale mohou vyvolat i specifickou neodpovídatost nebo dokonce toleranci vůči danému imunogenu.

## Imunoanalytické metody

Předností imunoanalytických metod je jejich **vysoká citlivost a přesnost**, dovolující v různých biologických materiálech běžně stanovovat látky obsažené v koncentracích řádově  **$10^{-9} \text{ mol.l}^{-1}$  až  $10^{-15} \text{ mol.l}^{-1}$**  a to většinou bez předchozí úpravy vzorků

Existuje několik možností a kritérií, podle nichž lze imunoanalytické metody dělit a charakterizovat:

- podle základního metodického principu – **kompetitivní** a **nekompetitivní** metody,
- podle nutnosti separace volné a vázané frakce indikátoru – **heterogenní** a **homogenní** metody,
- podle druhu použitého indikátoru.

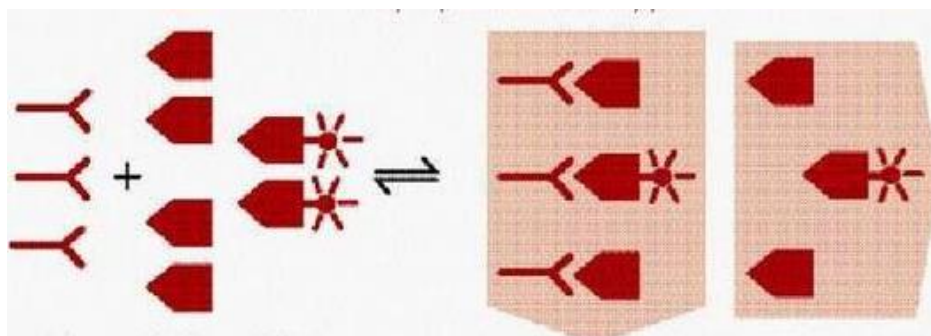
## Kompetitivní metody

V případě **kompetitivních metod** je specifická protilátka (Ab) v reakci přítomna v omezeném množství. O její vazebná místa soutěží (kompetují) značený antigen ( $\text{Ag}^*$ ) a stejný, avšak neznačený antigen (Ag), který je přítomen v analyzovaném vzorku a jehož množství stanovujeme. Dochází k saturaci vazebných míst protilátky oběma antigeny:



Graficky je kompetitivní imunoanalýza znázorněna na Obrázku 2

*Obr : Schéma kompetitivní imunoanalýzy*

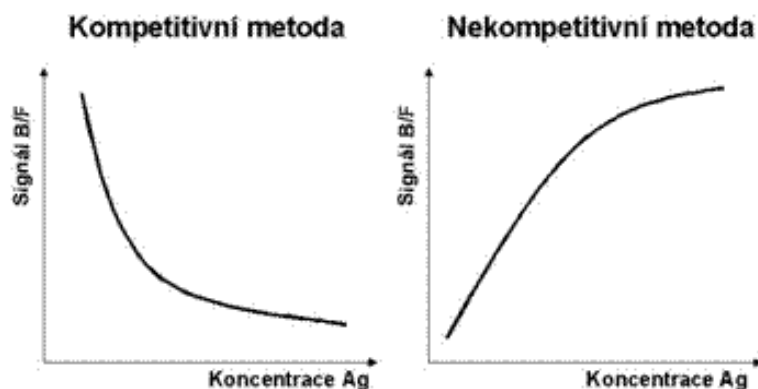


Při praktickém provádění této metody se do všech reakčních zkumavek pipetují konstantní množství protilátky a značeného antigenu; množství antigenu je vždy větší než množství protilátky. Množství protilátky je proto nedostačující k navázání všech přítomných molekul antigenů. Výsledkem reakce je vznik dvou imunokomplexů, neznačeného ( $\text{Ag-Ab}$ ) a značeného ( $\text{Ag}^*\text{-Ab}$ ). V reakční směsi zůstávají i antigeny nenavázané ( $\text{Ag}^*$ , Ag), tj. volné. V rovnovážném stavu reakční směsi je množství vznikajícího značeného komplexu ( $\text{Ag}^*\text{-Ab}$ ) nepřímo úměrné množství přítomného neznačeného antigenu (Ag). Podíl značeného antigenu (indikátoru), vázaného na protilátku (množství značeného komplexu  $\text{Ag}^*\text{-Ab}$ ), se obvykle označuje jako vázaná frakce (B - "bound"). Jako volná frakce (F - "free") se označuje množství nevázaného indikátoru  $\text{Ag}^*$ . Pro kvantitativní vyhodnocení je nutná vzájemná separace obou frakcí, která se provádí různými fyzikálně-chemickými postupy. Po jejich oddělení je nutné změřit odezvu alespoň jedné z frakcí. Podle druhu použitého indikátoru je měřenou odezvou radioaktivita, absorbance, fluorescence, luminiscence apod. Na základě analýzy kalibrátorů lze pak (znázornit grafickou závislost měřené odezvy (např.



poměrů B/F - osa y) na koncentraci antigenu (osa x) a tak sestavit kalibrační závislost (Obrázek 3). V případě kompetitivních metod získáme v lineárních souřadnicích křivku ve tvaru hyperboly. Jestliže se za stejných podmínek jako kalibrátory analyzuje vzorek s neznámým obsahem antigenu, pak lze určit z kalibrační závislosti jeho koncentraci.

**Obrázek 3: Charakteristické kalibrační závislosti u kompetitivních a nekompetitivních metod**



Kompetitivní metody jsou základem nejstarší imunoanalytické metody, radioimunoanalýzy (RIA).

### Nekompetitivní metody

Specifická protilátka (Ab) je v reakci přítomna v nadbytku. S ní reaguje stanovovaný antigen (Ag) a pro kvantifikaci slouží vhodně označená specifická protilátka (Ab<sup>\*</sup>). Průběh lze opět zjednodušeně popsat vztahem:

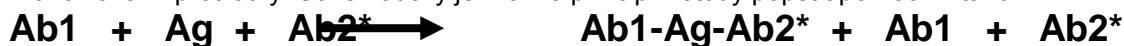


Množství komplexu [Ag-Ab<sup>\*</sup>] je tentokrát přímo úměrné množství stanoveného antigenu (viz kalibrační závislost, Obr. 1.6). Kalibrační závislost má stoupající charakter, který je v určitém rozsahu koncentrací více či méně lineární.

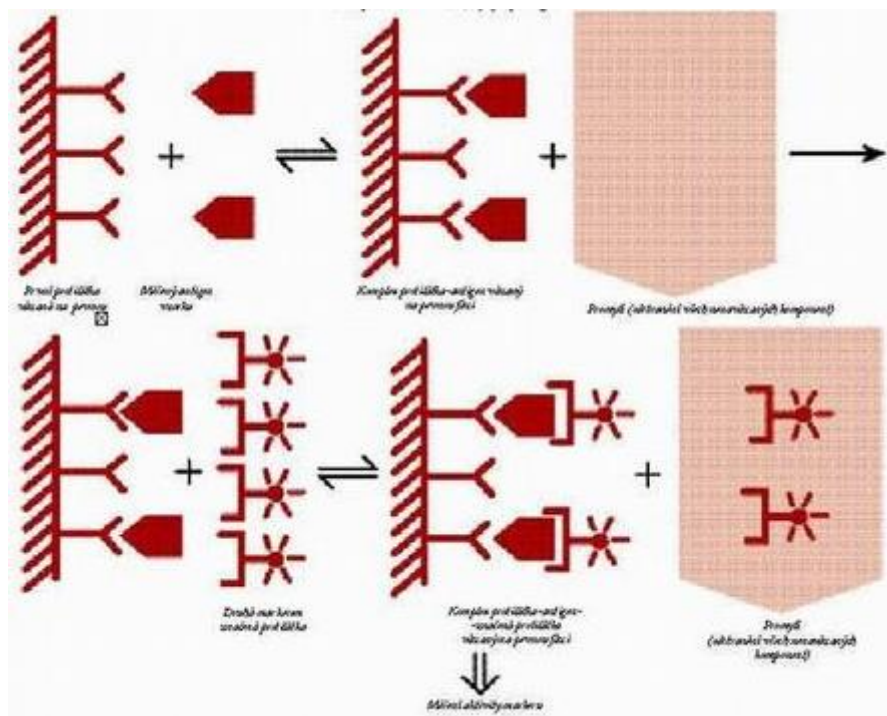
Nekompetitivní imunoanalytické metody jsou často označovány také jako metody imunometrické.

V praxi však není obvykle používán výše popsaný jednoduchý princip reakce. Jeho nejužívanější modifikací je tzv. "two-site" imunometrická analýza (Obrázek 1.7), kdy vedle do reakce vstupují jako vazebné reagenty dvě specifické protilátky, obě jsou přítomné v nadbytku. Každá z nich je namířena proti jiné antigenní determinantě stanovovaného antigenu. Neznačená protilátka (vychytávací – „capture“) bývá zakotvena na stěnu reakční zkumavky nebo na jinou pevnou fázi (partikule, kuličky) a slouží k vychytání a připevnění komplexu antigen-značená protilátka na tuto pevnou fázi, čímž podstatným způsobem usnadňuje separační krok metody. Druhá protilátka slouží jako indikátor průběhu reakce (signální protilátka).

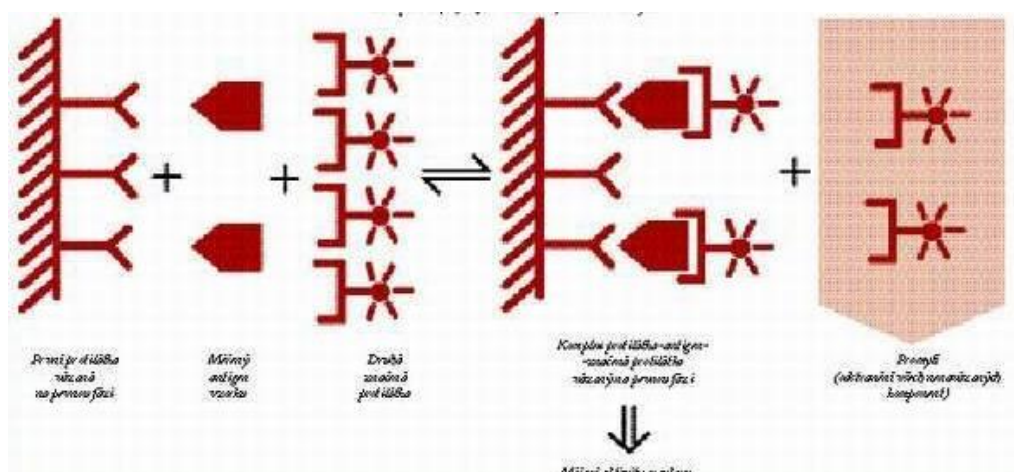
V případě nekompetitivních imunometrických metod našly velké uplatnění monoklonální protilátky. Schematicky je možno princip metody popsat pomocí vztahu:



Obrázek 4 Schéma jednokrokové imunoanalýzy



Obrázek 5 Schéma dvoukrokové imunoanalýzy



I v tomto případě je množství indikátoru konstantní (tentokrát jim však je značená protilátka), a proměnlivé je množství stanovovaného antigenu (ve vzorcích nebo kalibrátorech). Pro kvantifikaci analýzy je rovněž třeba separovat vázanou a volnou frakci indikátoru. Obvykle se měří množství vzniklého značeného komplexu [Ab1-Ag-Ab2\*], které, je přímo úměrné množství určovaného antigenu. Nezareagovaná (přebytečná) signální protilátka je po ukončení reakce odstraněna ze systému.

## Heterogenní a homogenní metody

Heterogenní metody, na rozdíl od homogenních, vyžadují separaci volné a vázané frakce indikátoru.

K separaci byla a je používána řada principů a tím i různých činidel, od původně nespecifických metod používaných v počátcích imunoanalýzy (spolusrážení polyethylenglykolem nebo adsorpce na povrchu aktivního uhlí) přes specifitější metody druhé protilátky (např. prasečí protilátka proti králičím imunoglobulinům) až k současně nejužívanějším technikám, které využívají různé typy pevných fází (stěny zkumavek nebo reakčních jamek, mikročástice, různé partikule apod.).

Každá separační technika má své výhody a nevýhody. Při jejím výběru je nutno přihlížet k vlastnostem jednotlivých komponent přítomných v reakční směsi i k charakteru imunochemické reakce.

Obecně lze shrnout, že všechny využívané separační techniky by měly splňovat několik základních požadavků:

- kvantitativní oddělení obou frakcí tak, aby jedna (případně obě) mohly být měřeny,
- stejná účinnost pro kalibrátory i analyzované vzorky,
- dobrá opakovatelnost (tj. přesnost v jednom stanovení) i reprodukovatelnost (mezi jednotlivými analýzami),
- rychlost, jednoduchost ekonomická únosnost.

## Indikátory u imunoanalytických metod

Obecně se jedná o antigeny nebo protilátky, které jsou vhodným způsobem označeny a tak umožňují monitorování průběhu imunoanalytické reakce. Tyto látky jsou schopny buď samy o sobě produkovat detekovatelný signál (přímo, nebo po vhodné inicializaci), případně jeho produkci zprostředkovaně vyvolat.

Další podmínkou sledování výsledku reakce je potřeba detekce pouze jedné části indikátoru použitého v imunochemické reakci. Jeho celkové množství je v závislosti na průběhu reakce rozděleno do tzv. **volné frakce (F)** a v imunokomplexu **vázané frakce (B)**. K vyčíslení podílu jedné z nich je obvykle nutno provést jejich **separaci**, tedy rozdělení vázané a volné frakce indikátoru. Pro tyto účely byla a je používána řada separačních principů a tím i různých činidel.

Základním problémem generování signálu a systému jeho detekce je především výběr takového způsobu, který je co nejlépe rozlišitelný od šumu pozadí a přitom vykazuje minimální nespecifické efekty. Imunoreaktivita značené látky má být identická s imunoreaktivitou látky neznačené.

Jako první indikátory byly v imunoanalýze používány substance značené vhodným radionuklidem. Nejčastějším radionuklidem využívaným k přípravě indikátorů pro účely radioimunoanalýzy je  $^{125}\text{I}$ . Vedle něj se v praxi využívají i jiné radionuklidy, například  $^3\text{H}$ ,  $^{12}\text{C}$  nebo  $^{57}\text{Co}$ . Obecným požadavkem na radioindikátor je, aby byl radiochemicky čistý, tedy aby obsahoval radionuklid vázaný pouze v jedné chemické formě.

Později (ve snaze o získání stabilnějších indikátorů s vyšší specifickou aktivitou) byly ke značení využívány i neradioaktivní značky. Místo radionuklidů jsou používány především:

- enzymy
- látky, které přímo vykazují fluorescenci nebo luminiscenci
- enzymy, které katalyzují vznik takovýchto látek
- latexové částice
- molekuly, které tvoří volné radikály

Odlišné zdroje generování signálu vyžadují samozřejmě odlišný způsob jeho detekce. Místo měření radioaktivity se tak užívá principů:

- kolorimetrie - měření absorpce světla roztokem zbarveným po proběhlé enzymatické reakci
- fluorometrie - měření fluorescence indikátorů nebo vzniklého produktu enzymatické reakce
- luminometrie - měření produkce světelných kvant luminiscenční reakce
- nefelometrie - měření rozptylu světelného záření na povrchu částic
- turbidimetrie - měření zeslabení světelného záření vlivem zákalu roztoku

- počítání částic - počítání částic určité velikosti poté, co proběhla imunochemická reakce.

## IMUNOANALYTICKÉ METODY A TECHNOLOGIE

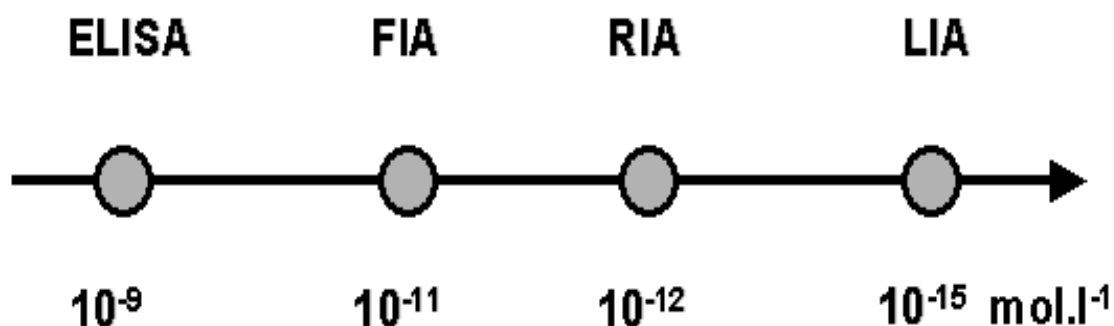
### Radioimunoanalytické metody

Radioimunoanalytické metody jsou metody, kde indikátorem imunochemické reakce je vhodný radionuklid. Pro kompetitivní metody používáno označení "**radioimunoanalýza**" - **RIA**. Pro nekompetitivní metody bylo zavedeno označení "**imunoradiometrická analýza**" a zkratka **IRMA**.

Při splnění obecných podmínek pro práci s otevřenými zářiči a likvidaci radioaktivních odpadů není riziko plynoucí z práce s radionuklidy zásadně větší než při práci s neizotopovými metodami, a je převyšováno rizikem plynoucím z práce s potenciálně infekčním materiálem (infekce HBV, HCV, HIV). Obdobně přístrojové vybavení je zhruba přibližně stejně drahé.

### Neizotopové metody

Zásadním přínosem některých neizotopových imunoanalýz je skutečnost, že dosahují lepší citlivosti stanovení viz následující schéma..



*Charakteristické citlivosti imunoanalytických metod. ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay, FIA = fluorescenční imunoanalýza, RIA = radioimunoanalýza, LIA = Luminiscenční imunoanalýza.*

V neizotopových metodách byla využita celá řada látek, které teoreticky dosahují vyšší citlivosti detekce než je měření radioaktivity a látky používané pro značení mohou generovat větší množství signálu. Podstatnou výhodou neizotopových imunoanalýz je možnost jejich snazší automatizace.

### Enzymová imunoanalýza (EIA)

Enzymová imunoanalýza využívá jako indikátor enzym. Enzym je chemicky (kovalentně) vázán buď na antigen, nebo protilátku – vznikne **enzymový konjugát** (viz...). Uspořádání je možné jak kompetitivní, tak nekompetitivní. Enzym katalyzuje chemickou přeměnu substrátu, který je přidán do reakční směsi, na produkt, který je barevný. Stanovuje se pak spektrofotometricky (viz chromogenní substrát), nebo na základě fluorescence (fluorimetrické stanovení). Koncentrace produktu je úměrná koncentraci antigenu nebo protilátky ve vzorku.

## Heterogenní enzymové imunoanalýzy

Po proběhnutí imunochemické reakce (inkubaci) je z reakční směsi obvykle odstraněna volná frakce indikátoru většinou s využitím pevné fáze. Následuje přidavek enzymového substrátu a po pevně určené době je reakce mezi enzymem a substrátem zastavena (např. přidáním "stop" činidla) a spektrofotometricky je měřeno zeslabení monochromatického světla roztokem. Pomocí kalibrační křivky lze poté odečítat koncentrace analyzovaných vzorků.

Nejznámější heterogenní enzymovou imunoanalýzou je **ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assai)**. Existuje mnoho variant této metody, společným znakem je zakotvení (adsorpce nebo kovalentní navázání) antigenu nebo protilátky na nerozpustný nosič (často povrch reakční nádoby nebo mikrotitrační destičky), což usnadňuje separaci imunochemicky navázaných molekul.

Z hlediska provedení jsou homogenní EIA jednoduché, avšak mnohem méně citlivé než metody heterogenní. Užívají se ke stanovení nízkomolekulárních látek (léků, hormonů a metabolitů). Příkladem je metoda **CEDIA** (Cloned Enzyme Donor Immunoassay) nebo **EMIT** (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique), využívané např. v toxikologii.

## Enzymové konjugáty

Klíčovým problémem EIA je právě příprava vhodných enzymových konjugátů, tedy látek, kde je enzym chemicky vázán na stanovovaný antigen nebo protilátku. Základní podmínkou úspěšné EIA je rovněž výběr vhodného enzymu, který musí splňovat řadu obecných podmínek:

- musí mít vysoké číslo přeměny,
- aktivita enzymu musí být přesně a snadno měřitelná
- enzym musí zachovávat enzymovou aktivitu po vazbě na antigen nebo protilátku (heterogenní EIA), nebo enzymová aktivita musí být výrazně modulována vazbou konjugátu na protilátku (homogenní EIA)
- enzym musí být snadno dostupný
- enzym se nesmí vyskytovat v tělní tekutině, ve které je prováděno vyšetření

U homogenních EIA se jako enzymy používají například glukozo-6-fosfátdehydrogenáza nebo malátdehydrogenáza. Nejčastěji používanými enzymy v heterogenní EIA jsou křenová peroxidáza nebo alkalická fosfatáza.

## Detekce enzymatických imunoanalýz

**Kolorimetrická (fotometrická) detekce** je nejrozšířenější typ detekce u klasických enzymoimunoanalýz. Principem detekce je zeslabení intenzity světelného toku monochromatického světla zbarveným roztokem produktu enzymatické reakce. Přístroje pro měření absorbance se nazývají spektrofotometry.

**Nefelometrická detekce** využívá enzym lysozym a jako substrát peptidoglykany. Jako substrátu bylo využito fragmentů buněčných stěn bakterií *Micrococcus luteus*. Paprsek monochromatického světla (např. laserového zdroje) je rozptylován tzv. Faraday-Tyndalovým jevem v zakaleném roztoku částic. Míra rozptylu světla je úměrná množství částic, tedy aktivitě enzymu. Moderní nefelometry jsou vybaveny laserovými zdroji přísně monochromatického světla, což zjednodušuje další konstrukci přístrojů.

**Fluorometrická detekce** umožňuje dosažení vyšší citlivosti při použití stejného enzymu, například díky opakovanému generování signálu v krátkém časovém úseku. Dosahovaná citlivost metody je ovšem omezena fluorescenčním pozadím biologického materiálu v reakční směsi. To je způsobeno přirozenou fluorescencí séra nebo plazmy (vlivem přítomností sérových proteinů, nebo NADH a bilirubinu). Detekce emitovaného světelného záření může být poznamenána i zhášením fluorescence vlivem přítomností některých molekul, které absorbují záření (excitační nebo emitované).

I v homogenních EIA byly využity fluorogenní substráty. Např. redukcí vzniklý NADH emituje fluorescenční záření mezi 450 až 470 nm.

Tento nebo obdobný princip detekce je využíván v celé řadě analytických systémů, například technologie MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay) na analyzátořech IMx a AxSYM firmy Abbott

*Obrázek 6: Příklad AxSYM (Abbott Laboratories)*



..

**Luminometrická detekce** je odvozena od principu bioluminiscence, spojené s enzymatickou reakcí. V tomto případě se však jedná o chemiluminiscenci, kdy je světelné záření produkováno vlivem průběhu chemické reakce iniciované působením enzymu. V praxi jsou i pro tyto účely nejpoužívanějšími enzymy alkalická fosfatáza a křenová peroxidáza. Pro první z nich jsou jako substrát využívány např. látky na bázi adamantyl 1,2 dioxetan arylfosfátů. Ty po odštěpení fosfátové skupiny vytvářejí nestabilní anion, který se stabilizuje vyzářením světla. Tento princip je využíván například u analyzátořů řady IMMULITE firmy DPC nebo analyzátořů Access firmy Beckman – Coulter

*Obrázek 7: Příklad Access*



Při použití enzymu křenové peroxidázy, dochází v přítomnosti peroxidu vodíku k oxidaci luminolu. Při reakci je však produkce světelného záření slabá. Byla ale objevena řada látek, které zesilují a prodlužují produkci světelných kvant této oxidační reakce. Takovým zesilovačem je např. luciferin nebo benzthiazoly, které mají ještě vyšší kvantové výtěžky. Reakce dává s použitím těchto zesilovačů kontinuální výstup světelného signálu.

### *Luminiscenční imunoanalýza*

Luminiscence je fyzikální jev, kdy látka, označovaná jako luminofor, je schopná produkovat světelné záření. Toto generování světelných záblesků je obvykle iniciováno změnou vnějších podmínek (pH, teploty, elektrického potenciálu apod.), která ovlivní fyzikálně-chemické vlastnosti některých molekul luminoforu. Dříve stabilní látka se tak dostane do energeticky nestabilního stavu s přebytkem vnitřní energie, kterou samovolně uvolňuje

vyzářením elektromagnetického záření o vlnové délce v oblasti viditelného světla. Tímto procesem se molekula látky opět stabilizuje, i když v pozměněné podobě.

K měření luminiscence slouží přístroje nazývané luminometry. Jak vyplývá z podstaty jevu, nevyžaduje měření luminiscence žádný excitační zdroj záření, měří se pouze světlo produkované luminoforem.

Jako luminoimunoanalytické metody lze označit ty metody, u kterých je pro značení indikátoru imunochemické reakce použit luminofor. Jak bylo uvedeno výše, jsou však mezi luminoimunoanalýzy často zahrnovány rovněž enzymové imunoanalýzy s luminometrickou detekcí. Imunoanalýzy zakončené detekcí luminiscenčního záření lze tedy rozdělit na dvě kategorie:

- enzymové imunoanalýzy se substrátem produkujícím luminiscenční záření
- imunoanalýzy s luminiscenčním indikátorem

Základní principy uplatňované u LIA jsou modifikací těch, které byly zmíněny v obecné části o imunoanalytických metodách. Z hlediska použitého luminoforu je možno LIA metody rozdělit na metody bioluminiscenční a chemiluminiscenční.

### *Bioluminiscenční metody*

Bioluminiscenční metody používají luminofory biologického původu. Vzhledem k tomu, že většinou využívají k inicializaci enzymatické reakce, je možno zařadit je mezi EIA s luminiscenční detekcí.

### *Chemiluminiscenční metody*

Chemiluminiscenční metody využívají jako luminofory různé látky, které jsou k produkci světelného záření iniciovány na základě průběhu chemické reakce. Produkce světla chemickou reakcí je časově omezena a je proto nezbytné, aby měření proběhlo v určitém definovaném okamžiku.

Mezi látky, které vykazují luminiscenci, patří např. již zmíněný luminol, izoluminol, lucigenin, sulfonamidy nebo estery akridinových barviv. Luminiscence umožňuje detekci látek v koncentraci do  $10^{-18}$  mol.L<sup>-1</sup>. V praxi je tento princip uplatněn v analyzátoru ACS:180 původní firmou Ciba Corning, nyní je dodáván firmou Bayer ve variantě ACS:180 SE nebo automat ADVIA Centaur a systému Architect firmy Abbott.

*Obr. 9: Přístroj Architect*



## Elektrochemiluminiscenční metody

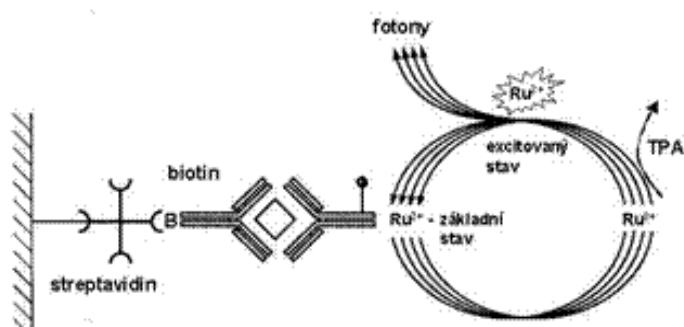
K vybuzení chemiluminiscence indikátoru je u těchto metod používán elektrický impuls. Příkladem může být indukce luminescence rutheniových iontů, komplexně vázaných v tris(bipyridylu), která probíhá na povrchu platinové elektrody (Obrázek 2.5). Molekulová hmotnost rutheniového komplexu (pod 1 kDa) umožňuje přípravu indikátoru, který neovlivňuje interakci protilátka-antigen. Tento princip využila například firma Roche u svých analyzátorů řady Elecsys nebo Modular.

Obrázek 10: Příklad Elecsys



Imunoanalytická reakce probíhá na pevné fázi, která je tvořena magnetickými mikročasticemi s navázaným streptavidinem. Na něj se váže biotinylovaný antigen nebo vychytávací protilátka (v závislosti na kompetitivním nebo nekompetitivním typu reakce). Detekční protilátka je označena rutheniovým komplexem. Po proběhlé imunochemické reakci je reakční směs nasáta do měřicí buňky, kde jsou magnetické částice přichyceny permanentním magnetem a promyty pufrům. Na elektrody měřicí buňky je přiveden budící elektrosignál a nastartována elektrochemická reakce. Během ní dochází k oxidaci iontů  $\text{Ru}^{+2}$  na  $\text{Ru}^{+3}$  a následně jejich opětovné redukci na energeticky excitované ionty  $\text{Ru}^{+2}$ , které se přebytečné energie zbavují emisí luminescenčního záření o vlnové délce 620 nm. Cyklická reakce je podmíněna oxidací a následnou redukcí přítomného tripropylaminu (TPA). Celý cyklus je vratnou reakcí a může tak být několikanásobně opakován, čímž se produkce luminescenčního záření podstatně zvyšuje. Chemiluminiscence je přímo úměrná množství analytu tvořícího imunokomplex v rozmezí téměř 6 řádů.

Obrázek 11: Elektrochemiluminiscence - generování a detekce signálu



## Standardizace metod

Standardem se obecně rozumí určovaná látka (analyt) s deklarovanou koncentrací. Musí jít o čistý, homogenní, stabilní preparát analyzované látky, který má v ideálním případě definovanou strukturu a molekulovou hmotnost. Tato



podmínka však v mnoha případech v praxi nemůže být splněna. Lze proto hovořit o dvou skupinách standardů v závislosti na vlastnostech látek, ze kterých jsou připravovány a pro jejichž stanovení jsou používány.

Do první skupiny patří látky se známým složením (tím i strukturou a molekulovou hmotností), které mohou být produkovány chemickou syntézou s velmi vysokou čistotou (99,9%). Příkladem mohou být jednodušší biologicky aktivní látky, jako jsou steroidy, thyreoidální hormony nebo léky, které jsou komerčně dostupné v čisté formě. Tyto látky mohou sloužit pro i přípravu primárních standardů nejvyšší metrologické kvality. Pracovní roztoky standardů (kalibrátory pro měřicí metodu) je možno připravit rozpuštěním přesné navážky standardu v přesně známém objemu vhodného rozpouštědla.

Do druhé skupiny patří látky, jejichž struktura naopak není úplně jednoznačně definovatelná. Tyto látky není možné připravit chemickou syntézou a získávají se tak jinými postupy, například izolací z biologických materiálů, často s obtížným zajištěním reprodukovatelnosti výsledku. U těchto preparátů mohou nastávat problémy s homogenitou, znečištěním látkami s příbuznými vlastnostmi, prekursory a metabolity. Takovéto látky nemohou být dostatečně definovány chemickými a fyzikálními metodami, takže u nich není možné zajistit návaznost na jednotku SI a pro numerické vyjadřování velikosti odpovídajících veličin jsou pak používány mezinárodně dohodnuté jednotky (IU). Tak je tomu např. u řady složitějších biologicky aktivních látek jako například proteinových či peptidických hormonů, nádorových markerů bílkovinné povahy apod. Ze skutečnosti, že se v těchto případech nejedná o adekvátně definované analyty pak vyplývá i fakt, že pravá hodnota měřené veličiny je v těchto případech tudíž reálně neznámá.

Z hlediska použití standardu v imunoanalytické metodě je rovněž nutným požadavkem, aby se jednalo o preparát, který je v maximální míře imunochemicky shodný s určenou látkou.

## **Preanalytika**

---

Preanalytika je nedílnou součástí laboratorního vyšetření a lze ji rozdělit na část, která probíhá mimo laboratoř a na část, která v laboratoři. Chyby ve výsledku laboratorního vyšetření vznikají v nadpoloviční většina již ve fázi preanalytické. Preanalytika ovlivňují jednak biologické faktory ovlivňující hladinu měřené látky in vivo a jednak mechanické a tepelné působení při odběru, separaci, transportu a skladování, které můžou změnit studovanou hladinu v biologickém materiálu. V preanalytické fázi se všechny faktory prolínají.

## **Biologické vlivy**

---

Biologické vlivy jsou ovlivnitelné a neovlivnitelné, Neovlivnitelné faktory jsou í pohlaví, věk, etnická příslušnost vyšetřovaného a také genetické predispozice. Všechny ostatní preanalytické faktory můžeme, alespoň částečně, ovlivnit;

Vyšetřovaný by se měl pacient před odběry vyvarovat velmi tučných jídel, což způsobuje chylozitu séra, která často interferuje během stanovení. Užívané léky můžou ovlivnit hladiny stanovovaných látek třemi způsoby působí na metabolismus stanovované látky ovlivňují vazbu sledované látky na transportní bílkoviny (změna volné frakce) ék interferuje v analytické reakci. Ideálem by bylo před odběry vysadit veškeré léky, ale to není v praxi obvykle možné. Je nutné znát alespoň interference léků.

Hladinu mnoha biomarkerů ovlivňuje psychika a především stres pacienta – nervozitou nebo strachem jsou především stresové hormony např. kortizol, katecholaminy, interleukin 6, je tedy nutné před odběrem co nejvíce vyšetřovaného uklidnit a snažit se zamezit tzv. syndromu bílého pláště. Hladinu látek v krvi také ovlivňuje poloha pacienta při odběru – tedy zda je odebírán vleže (často u pacientů na lůžkových odděleních) nebo v sedě (nejčastěji u ambulantních pacientů). Pro výsledné hodnoty stanovení je rozhodující také fyzická činnost vyšetřovaného před náběrem – zda vyběhl do druhého patra před odběrem po schodech (zvýšené hodnoty stresových hormonů, některých interleukinů...) nebo jel výtahem, zda přijel na kole/na koni (zvýšené hodnoty PSA), zda neuběhl den před odběrem maratón atd.

Mnoho látek cirkulujících v lidském oběhu podléhá biorytmům neboli cyklickým variacím:

- cirkadiánní – v rámci 24 hodin
- ultradiánní – s periodou mnohem kratší než jeden den
- infradiánní – s periodou delší než jeden den
- cirkanuální – s periodou přibližně 1 rok

Důsledkem jsou změny koncentrací látek v denním, ročním, u žen menstruačním cyklu a v průběhu těhotenství, některé látky jsou vyplavovány v pulzech. Hormony jsou často ovlivněny variacemi jiných látek/hormonů, které jsou nadřazeny při regulaci jejich uvolňování v organismu (nejznámějším příkladem je regulatorní osa ACTH pro kortizol). Základní přehled o konkrétních příkladech můžete získat např. v Encyklopedii laboratorní medicíny pro klinickou praxi, pro nově studované markery ale tyto údaje často nejsou k dispozici.

Ve výzkumu je z těchto důvodů často důležité provádět náběry v definovanou denní dobu – standardně mezi 7-9 hod. ranní, v definovanou fázi menstruačního cyklu pokud je jím studovaná látka ovlivněna a provádět např. statistické zhodnocení korelace data náběru a naměřené hodnoty pro poznání sezónních vlivů. Tento problém se řeší dále opakováním odběrů nebo různými inhibičními nebo stimulačními testy, to však probíhá především v rutinní praxi.

## Odběr materiálu

Nejčastějším odběrem biologického materiálu je odběr periferní krve z kubitální žíly. Pro tento odběr existují tři základní pravidla, která je nutno dodržet:

- nezaškrcovat paži během odběru,
- nechat oschnout dezinfekci v místě vpichu před odběrem (jinak dochází k hemolýze) a
- neprovádět odběry ze stejné ruky, kde pacient dostává infuzi.

Pokud je prováděn odběr z trvale zavedené kanyly, je nutné nejprve 5 ml krve odebrat a následně pak teprve brát krev pro stanovení. Stěžejním pro laboratorní vyšetření je výběr odběrové zkumavky. Je nutné zohlednit, zda je třeba k vyšetření sérum (odebírání se krev sráží, ve zkumavce proběhne koagulace) nebo zda je třeba plazma (krev je odebrána do zkumavky obsahující protisrážlivé činidlo). Zkumavky pro odběry plazmy se liší použitým antikoagulačním činidlem- heparinát, citrát, EDTA soli. Pro imunoanalýzu se nejčastěji používají odběry s EDTA, ale laboratoř by měla pro každé vyšetření i výzkumné stanovit přesně požadavek na odběrové zkumavky, protože hladiny mezi sérem a plazmou se pro některé analýzy mohou výrazně lišit. Pro tvorbu biobank by měly být skladovány jak plazmové tak sérové alikvoty a v publikacích by měl být vždy jasně specifikován typ použitého biol.

materiálu a nejlépe i odběrových zkumavek.

Samozřejmostí je nutnost bezchybného a bezpodmínečného označení biologického materiálu – jak primárního materiálu tak skladovaných alikvotů po separaci – aby se předešlo jakýmkoli záměnám, co se týče pacienta i typu materiálu. V případě speciálních odběrů – např. netradičních míst odběru nebo testů v čase – je nutné jednoznačné rozlišení jednotlivých odběrů př. číslicemi nebo písmeny na zkumavkách i na žádankách.

V biologickém materiálu dochází k degradaci proteinů proteolytickou aktivitou některých enzymů. Tato aktivita negativně ovlivňuje stanovitelnost proteinů především v homogenátech tkáňových vzorků, ale může být nezanedbatelná i pro imunoanalytická stanovení proteinů v plazmě nebo séru. Proteolýze můžeme předejít přidáním specifických inhibitorů proteáz nebo jejich koktejlů ke vzorku ihned po odběru u krevních derivátů nebo při homogenizaci (u tkáňových vzorků). Inhibitory proteáz můžeme rozdělit do skupin podle několika kritérií:

- dle typu inhibovaných enzymů
- podle živočišného druhu/rostliny
- podle typu analýzy, která bude prováděna
- podle typu biologického materiálu

Speciálním typem inhibitorů jsou inhibitory fosfatáz, které je nutné využívat při studiích monitorujících stav fosforylace některých proteinů v signálních drahách.

### **Separace a transport**

Při transportu a skladování je nutné se vyvarovat teplotních extrémů – v létě přehřátí vzorku, v zimě jeho zmrznutí – používáním transportních boxů. Některé analyty vyžadují speciální teplotu transportu, např. transport v ledové tříšti, což je směs vody a ledu v poměru jedna ku jedné: led ve vodě postupně odtává, což umožňuje udržet delší dobu vzorek při teplotě těsně nad bodem mrazu. Naopak některé látky při vystavení chladu můžou měnit své hladiny ve směru falešně pozitivního i negativního výsledku. Chybou je vždy zmrznutí zkumavky s odebranou krví před separací séra/plazmy od krevních buněk, protože to vede k hemolýze. Také vystavení vzorku nadměrnému světlu – např. ponechání vzorku na okně při silném slunečním svitu – může způsobit degradaci fotolabilních látek. Zkumavky s náběry pro měření látek velmi citlivých na světlo by měly být transportovány např. obalené v alobalu. Vždy by mělo být zamezeno třepání a prudké pohyby se zkumavkami s krví před separací, nadměrná mechanická zátěž vede nejčastěji k hemolýze.

Důležitým krokem v přípravě biol. materiálu z krve je centrifugace – separace séra nebo plazmy od krevních buněk. Jednotlivé laboratoře se liší používanými podmínkami – vždy by měla být uváděna doba centrifugace a použitá centrifugační (odstředivá) síla  $g$  (uvádění v otáčkách za minutu rpm je chybné neboť nezahrnuje velikost rotoru, která ovlivňuje odstředivou sílu). Tato odlišnost je jednou z příčin nestejných výsledků mezi jednotlivými laboratořemi. Speciální nastavení je třeba např. při požadavku na tzv. bezdestičkovou plazmu pro studium některých analytů, aby nedocházelo k ovlivnění měřené hladiny vyplavením intracelulárních komponent z trombocytů. Separace zajišťuje i zamezení vyplavování látek např. interleukinů z aktivovaných leukocytů. Sérum by mělo být před separací ponecháno srážet alespoň 30 min. po odběru. Naopak plazma může být separována ihned.

## Skladování

Biologický materiál pro výzkumné účely by měl být skladován v alikvotech odpovídajících množstvím potřebám analýzy a při dlouhodobém skladování v teplotách pod  $-70^{\circ}\text{C}$ . Moderní analytické postupy vyžadují poměrně malé množství materiálu a je tedy výhodnější skladovat více alikvotů s menším objemem. Zamezí se tak opakovanému rozmrazování, které je nežádoucí. U některých biomarkerů např. cytokeratinů víme, že opakované rozmrazování nezmění výsledek, ale u většiny nových biomarkerů nemáme tušení a proto se tzv. opakovaným freeze/thaw cyklům vyhýbáme. Důležitý je i správný výběr zkumavek pro dlouhodobé uskladnění – musí být vyrobeny z plastů odolávajícím nízkým teplotám a musí mít víčka dostatečně zamezující odpařování. Dále je nutné si uvědomit, že materiál nemůže být skladován nekonečně dlouho. Maximální doba skladování se liší pro jednotlivé analýzy, jejich hladiny se v průběhu let/měsíců mění. Ve výzkumu je proto důležité zvážit, zda bude vhodné jednorázové vyšetření biologického materiálu až po kompletním ukončení sběru (celé kohorty) nebo zda je výhodnější periodické zpracování např. vždy jednou za půl roku nebo dokonce kontinuální zpracování na rutinních analyzátoch, kde ale zase hrozí změna použité metodiky.

Samotná preanalytická fáze začíná již správným výběrem – indikací laboratorního vyšetření, v případě výzkumných projektů výběrem studovaného biomarkeru. Je nutné nejprve zjistit, co nejvíce o preanalytických podmínkách, které jsou nezbytné, a poté jim přípravu pacientů, odběry a nakládání s biologickým materiálem co nejlépe přizpůsobit. Velkým problémem většiny studií zůstává nestejně zacházení s náběry tzv. kontrolních skupin. Náběry jsou často zpracovávány v jiných laboratořích (např. transfúzní stanice), za jiných podmínek (doba a nastavení centrifugace), náběry jsou prováděny v jiných denních dobách (např. pouze ambulantní náběry v kontrolní skupině x celodenní náběry z lůžkových oddělení v cílové skupině). Velkou neznámou, co se týče jednotnosti podmínek a popisu preanalytické fáze, zůstávají velké biobanky, kde jsou pro jednotlivé diagnózy často dlouhodobě skladovány biologické materiály získané buď z mnoha pracovišť za kratší časový úsek, nebo naopak z jednoho pracoviště za velmi dlouhé časové období. Při studiích používajících takovýto biologický materiál by mělo být vždy součástí statického hodnocení zda výsledek neovlivňuje stáří náběru a jeho původ (tedy zda se neliší výsledky náběrů získaných různými pracovišti).

## LITERATURA

1. Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi – verze 9, (prosinec 2009) dosažitelné 9.12.2010 na [www.sekk.cz](http://www.sekk.cz)
2. Picotte M, Campbell CG, Thorland WG. Day-to-day variation in plasma interleukin-6 concentrations in older adults. *Cytokine*. 2009 Sep;47(3):162-5.
3. Arvidson NG, Gudbjörnsson B, Elfman L, Rydén AC, Tötterman TH, Hällgren R. Circadian rhythm of serum interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1994 Aug;53(8):521-4.

4. Shand B, Elder P, Scott R, Frampton C, Willis J. Biovariability of plasma adiponectin. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(10):1264-8. PubMed PMID: 17032140.
5. Flower L, Ahuja RH, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Effects of sample handling on the stability of interleukin 6, tumour necrosis factor-alpha and leptin. *Cytokine*. 2000 Nov;12(11):1712-6. PubMed PMID: 11052823.
6. Thavasu PW, Longhurst S, Joel SP, Slevin ML, Balkwill FR. Measuring cytokine levels in blood. Importance of anticoagulants, processing, and storage conditions. *J Immunol Methods*. 1992 Aug 30;153(1-2):115-24. PubMed PMID: 1381403.
7. Steptoe A, Willemsen G, Owen N, Flower L, Mohamed-Ali V. Acute mental stress elicits delayed increases in circulating inflammatory cytokine levels. *Clin Sci (Lond)*. 2001 Aug;101(2):185-92. PubMed PMID: 11473494.
8. Venkatraman JT, Pendergast D. Effects of the level of dietary fat intake and endurance exercise on plasma cytokines in runners. *Med Sci Sports Exerc*. 1998 Aug;30(8):1198-204. PubMed PMID: 9710857.
9. Venkatraman JT, Feng X, Pendergast D. Effects of dietary fat and endurance exercise on plasma cortisol, prostaglandin E2, interferon-gamma and lipid
10. peroxides in runners. *J Am Coll Nutr*. 2001 Oct;20(5):529-36. PubMed PMID:
11. Rai AJ, Gelfand CA, Haywood BC, Warunek DJ, Yi J, Schuchard MD, Mehigh RJ, Cockrill SL, Scott GB, Tammen H, Schulz-Knappe P, Speicher DW, Vitzthum F, Haab BB, Siest G, Chan DW. HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. *Proteomics*. 2005 Aug;5(13):3262-77. PubMed PMID: 16052621.
12. Zima T., *Obecný úvod k laboratornímu vyšetření*, v Zima T. , *Laboratorní diagnostika*, 2002, Galén
13. Wilde C.: *Subject Preparation, Sample Collection and Handling v The Immunoassay Handbook, Third Edition*, D. Wild (Editor), 2005, Elsevier