

Doporučení České společnosti klinické biochemie (ČSKB ČLS JEP), České onkologické společnosti (ČOS ČLS JEP), České společnosti nukleární medicíny (ČSNM ČLS JEP) – sekce imunoanalytických metod k využití nádorových markerů v klinické praxi

Autorský kolektiv:

Masarykův onkologický ústav Brno: Dalibor Valík, Miroslava Nekulová, Lenka Dubská

Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN Praha: Tomáš Zima, Drahomíra Springer, Ivan Malbohan

Centrální laboratoř pro imunoanalýzu LF UK a FN Plzeň: Ondřej Topolčan

Účel: Účelem tohoto doporučení je pomoci lékařům a pracovníkům klinických laboratoří orientovat se v racionálním používání nádorových markerů v klinické praxi.

Zdroje: Toto doporučení rámcově vychází z dokumentů publikovaných ASCO, NACB a EGTM (www.asco.org, www.nacb.org, www.egtm.eu). Doporučení dále zohledňuje dlouhodobé zkušenosti autorů s používáním nádorových markerů v péči o onkologického pacienta.

Limitace: Toto doporučení není myšleno jako náhrada úsudku ošetřujícího lékaře, stejně tak nemůže postihnout všechny možné situace, jež mohou nastat v klinické praxi. Odpovědností ošetřujícího lékaře je zajistit konkrétnímu pacientovi adekvátní péči.

Pojmy:

Analytická nejistota = nejistota výsledku měření představuje interval, ve kterém se nachází s deklarovanou mírou pravděpodobnosti skutečný výsledek měření

IQC = vnitřní kontrola kvality

Epitop = vazebné místo protilátky

Lead time = čas, který uplyne od první měřitelné elevace nádorového markeru do doby detekce návratu choroby pomocí zobrazovacích nebo jiných diagnostických technik

Rebaselining = paralelní analýza stejného vzorku pacienta předchozí a novou technologií za účelem zjištění korelace výsledků na klinickém materiálu

Grading choroby = stupeň diferenciacie nádoru

Staging choroby = určení stadia choroby

Prognóza choroby = předpověď chování choroby u konkrétního pacienta

Predikce efektu terapie = předpověď pravděpodobné odezvy pacienta na konkrétní léčbu

ROC křivka = rozhodovací operační křivka udávající vztah mezi senzitivitou a specificitou vyšetření

Senzitivita = správná pozitivita u jedinců s chorobou

Specificita = správná negativita u jedinců zdravých

1 Biologická povaha nádorových markerů

Nádorovým markerem rozumíme substanci přítomnou v nádoru nebo produkovanou nádorem nebo hostitelem jako odpověď na přítomnost tumoru. Tuto substanci lze využít k diferenciaci nádoru od normální tkáně, nebo uvažovat o přítomnosti tumoru na základě analýzy tělesných tekutin. Substanci lze měřit kvalitativně nebo kvantitativně metodami chemickými, imunologickými nebo metodami molekulární biologie. Mezi markery produkované tumorem patří enzymy (např. LD, NSE, PSA, thymidinkináza, prostatická kyselá fosfatáza), imunoglobuliny nebo jejich fragmenty či podjednotky (monoklonální imunoglobuliny, tzv. paraproteiny), hormony (např. hCG, PTH, ACTH, kalcitonin, gastrin, prolaktin, norepinefrin, epinefrin), fragmenty komplexních glykoproteinů, (např. CA19-9, CA15-3, CA125),

fragmenty cytokeratinů (TPA, TPS, CYFRA21-1), onkofetální antigeny (AFP, CEA), molekuly receptorové povahy (estrogenový a progesteronový receptor, receptor pro interleukin 2, HER2/neu a EGF) a cirkulující buněčné elementy (cirkulující nádorové buňky, cirkulující endotelové buňky a cirkulující endotelové prekurzory). Mimo obvyklé aplikace klasických (solubilních) nádorových markerů se zdají být klinicky užitečné jako nádorové markery i některé genetické abnormality, a to především pro specifikaci abnormality nádorových buněk určující způsob léčby. Jde jednak o přímou detekci mutací v DNA, proteinové produkty onkogenů (např. c-myc, c-fos, k-ras, src), změny v jejich posttranslačních modifikacích v maligní tkáni nebo o „nové“ genetické změny v maligní buňce (např. chromozomální rearrangement bcr-abl) nebo detekci mutací v tumor supresorových genech (BRCA1, BRCA2, p53).

2 Preanalytické aspekty

V současnosti se většina používaných solubilních nádorových markerů stanovuje v séru. Jde obvykle o štěpy velkých molekulárních komplexů, a proto nevykazují nádorové markery příliš velkou preanalytickou variabilitu. Doporučeným materiálem pro analýzu je sérum. Pro správnou interpretaci změn v hladinách markerů, zejména při dlouhodobém sledování nemocných s nádorovými chorobami, je třeba vyloučit možné rušivé faktory, které by mohly stanovení ovlivnit už v preanalytické fázi. V určitých případech mohou být výsledky analýzy ovlivněny některými postupy klinického vyšetřování; např. pro stanovení prostatického specifického antigenu (PSA) má být odebrána krev nejdříve 48 hodin po rektálním vyšetření prostaty, ovlivnit jeho hladinu může i jakákoliv manipulace s prostatou včetně jízdy na kole nebo sexuální aktivity. Kontaminace vzorku slinami nebo potem může znehodnotit stanovení antigenu skvamózních buněk (SCCA) nebo CA 19-9. Neuron-specifická enoláza (NSE) je při hemolýze významně uvolňována z erytrocytů, oddělení séra od krevních elementů je třeba provést nejpozději do 1 hodiny po odběru. Hemolýza nad 300 mg/l falešně zvyšuje výsledek stanovení NSE a LD. Příprava tkání k analýze tkáňových nádorových markerů se řídí standardními operačními postupy spádové bioptické laboratoře. Nádorovou tkáň určenou k vyšetření je třeba co nejrychleji doručit do laboratoře, aby se minimalizovala autolýza do okamžiku fixace materiálu. DNA pro účely vyšetření genetických markerů se izoluje dostupnými soupravami certifikovanými pro *in vitro* diagnostiku.

3 Vlastní laboratorní analýza

Měření hladiny nádorového markeru je třeba provádět pomocí technologie určené k *in vitro* diagnostice, kalibrované podle pokynů dodavatele technologie. Metodika musí být v souladu s Nařízením vlády č. 453/2004 Sb., ze dne 7. července 2004 v platném znění, kterým se stanoví technické požadavky na diagnostické zdravotnické prostředky *in vitro* a pravidelně sledována vnitřní kontrolou kvality. Pracoviště by mělo disponovat příslušně kvalifikovaným personálem znalým problematiky a pravidelně se účastnit procesu externího hodnocení kvality. K vyšetření koncentrace nádorových markerů jsou obvykle používány metody imunanalýzy, popř. se měří enzymové aktivity (LD). Potřeba dlouhodobého sledování pacienta vyžaduje neměnicí se technologii stanovení pro daný marker. Z tohoto důvodu by měla být laboratoř schopna zajistit dlouhodobě výsledek – pokud možno o stejné analytické nejistotě a vysoké reprodukovatelnosti. Pokud je změnu technologie nutné v praxi realizovat, je třeba nejprve provést srovnávací sérii měření na dostatečném množství konkrétních patientských vzorků pomocí obou souprav, aby laboratoř získala data o chování nové soupravy v konkrétních podmínkách (tzv. rebaselining). Analýza tkáňových nádorových markerů a DNA se řídí standardními operačními postupy příslušné histologické a genetické laboratoře.

4 Interpretace a zdroje interference

Vzhledem k širokému spektru nádorových onemocnění neexistuje univerzální nádorový marker. Obdobně senzitivita (správný záchyt nemocných) při dostatečné specificitě (správná negativita u lidí bez nádorového onemocnění) nedosahuje ideálních 100 %. Nezvyšená koncentrace nádorového markeru není tedy ještě důkazem nepřítomnosti maligního onemocnění, naopak pozitivní výsledek nemusí nutně znamenat přítomnost zhoubného nádoru. Vztah senzitivity a specificity markerů vyjadřuje ROC křivka (Receiver Operating Characteristics).

K obvyklým typům analytických interferencí patří:

a) zkřížená reaktivita strukturálně podobných molekul Jde o inherentní vlastnost imunologických metod, které prakticky nikdy nedocílí naprosté specifity protilátky vzhledem k zachycované analyzované molekule. Je odpovědností výrobce imunanalytické metody, aby informoval uživatele o zdrojích možné interference v příbalovém letáku soupravy. Na druhé straně si musí být uživatelé jisti, že se s možností zkřížené reaktivity u soupravy seznámili;

b) hook-efekt způsobený vysokou koncentrací markeru Stav, kdy velmi vysoká koncentrace analytu překročí vazebnou schopnost pevné fáze. Výrobce soupravy by měl s tímto typem interference počítat a jasně definovat lineární dynamický rozsah měření dané soupravy, respektive technologie. Laboratoře by měly mít k dispozici protokol, jenž řeší možnost výskytu tohoto jevu, periodicky provádět sledování linearity měření, a tak ověřit na vlastních vzorcích horní mez stanovitelnosti analytu. Typickým příkladem možnosti výskytu tohoto jevu je vysoká hladina hCG u choriokarcinomu;

c) přenos analyzovaného markeru mezi vzorky, tzv. carry-over

Jde o „technologický“ jev daný nedokonalým očištěním pipetovacích systémů analytické technologie aktuálně analyzovaného vzorku od stop vzorku předchozího o vysoké koncentraci analytu. Současné moderní imunanalytické systémy tento problém mají většinou již účinně vyřešen. U manuálních metod, např. destičkových ELISA, je třeba věnovat dostatečnou pozornost pečlivosti pipetování (kontaminace špiček apod.);

d) interference heterofilních a lidských anti-myších protilátek (HAMA)

Lidské heterofilní protilátky jsou endogenní imunoglobuliny, jež reagují s druhově odlišnými imunoglobuliny (myšími nebo králíčími) jak *in vivo*, tak *in vitro*. Tradiční Paul-Bunnelova reakce je založena právě na aglutinaci nespecifického antigenu králíčího původu sérem pacienta v akutní fázi infekční mononukleózy obsahujícím právě tyto „heterofilní“ protilátky. Většinou se objevují u patologických stavů spojených s polyklonální aktivací imunitního systému, typicky primoinfekce EB virem nebo u procesů spojených s autoimunitou, kde typickým příkladem je revmatoidní faktor. Lidské anti-myší protilátky jsou imunoglobuliny, které specificky reagují s epitopy myších imunoglobulinů. Mechanismus

interference heterofilů nebo HAMA protilátek spočívá buď v přemostění vazebného místa pro ligand, kdy se protilátka chová jako pozitivní interferent v blokaci primární či sekundární protilátky (obvykle negativní interference), nebo v přednostním vychytání antigenu před jeho vazbou na primární protilátku navázanou na pevnou fázi. Je primárně odpovědností výrobce analytického systému řešit tento typ interference, nicméně v praxi k němu může poměrně často docházet. Nejjednodušším postupem ověření klinického stavu neodpovídající naměřené hodnoty je stanovení téhož analytu, nejlépe z téhož vzorku (zkumavky, alikvoty) jinou imunoanalytickou technologií, jelikož pravděpodobnost výskytu téhož interferujícího jevu s rozdílnými protilátkami použitými jiným výrobcem je velmi malá. Pokud laboratoř nemá takovou možnost k dispozici, lze provést ředění vzorku v sérii alespoň 4 měření – není-li výsledek měření lineární, jde pravděpodobně o interferenci. Další postupy, jak ověřit přítomnost heterofilů nebo HAMA protilátek, sice existují (precipitace imunoglobulinů nebo jejich extrakce pomocí imunoafinitních kolon, sorpce pomocí proteinů A, G apod.), jejich provedení je ale většinou nad rámec činnosti klinických laboratoří a je vhodné se obrátit na specializovaná pracoviště.

Při interpretaci vyšetření solubilních nádorových markerů v klinické praxi se řídíme následujícími pravidly:

- **Screening** – vzhledem k poměrně nízké diagnostické senzitivitě a specifitě není většina nádorových markerů vhodná k tomuto účelu u asymptomatických vyšetřovaných. Problematiku zavedení screeningu karcinomu prostaty u mužů nad 50 let řeší dlouhodobě nejen odborné společnosti, ale i zdravotní pojišťovny, zatím bez dosažení názorové shody. Screening kolorektálního karcinomu pomocí vyšetření okultního krvácení je přes závažnost a rozšíření specificky v české populaci zatím záležitostí ojedinělých akcí.

U symptomatických nemocných nebo u skupin pacientů s vysokým rizikem vývoje nádorového onemocnění lze použít vyšetření některých nádorových markerů ke screeningu choroby. Jako příklad lze uvést screeningové vyšetřování kalcitoninu v rodinách s výskytem medulárního karcinomu štítné žlázy, nebo vyšetření CA 15-3 spolu se zobrazovacími metodami, dnes nejlépe MRI, v rodinách s mutacemi v genech BRCA1 a BRCA2.

- **Primární diagnostika** – podobně jako pro screening onemocnění nejsou nádorové markery často vhodné ani pro primární diagnostiku z důvodů analogických.

- **Staging** – tímto pojmem rozumíme posouzení anatomického rozsahu onemocnění; vysoká hodnota nádorového markeru v séru např. může upozornit na nesprávně určené nižší stadium choroby.

- **Prognóza** – určení prognózy onemocnění není podstatnou rolí solubilních nádorových markerů. Určitý význam má AFP a hCG u germinativních tumorů, CEA u kolorektálních karcinomů, případně beta-2-mikroglobulin u myelomů.

- **Sledování průběhu choroby** – je hlavní indikací těchto vyšetření. Vzestup hladin nádorových marke-

rů představuje včasné upozornění, které předchází klinickou diagnózu návratu (rekurence) choroby, tzv. lead time.

- **Účinek terapie** – sledování účinku terapie pomocí nádorových markerů je významnou indikací vyšetření solubilních nádorových markerů (tab. 1). Vzhledem k různým biologickým poločasům jednotlivých markerů je nutno správně volit intervaly odběrů krve k vyšetření tak, aby se skutečně postihl efekt terapie, nikoli pouze tzv. lysis fenomén, tj. prudké zvýšení koncentrace markeru jako důsledek cytolyzy po bezprostředním působení protinádorové terapie.

- **Frekvence vyšetření** – pro frekvenci vyšetřování platí kritéria doporučená WHO a podle zkušeností kliniků i statistiků hodnotících dynamiku změn nádorových markerů ve vztahu ke klinickému průběhu choroby je třeba dodržovat doporučenou frekvenci vyšetření. V průběhu primární terapie může onkolog zvolit monitorování odpovědi na léčbu pomocí vhodného solubilního nádorového markeru v intervalu kratším než jeden měsíc. Po ukončení první linie chemoterapie se obvykle doporučují tyto intervaly: 1 měsíc v prvním půl roce po primární terapii, 2 měsíce ve druhé polovině roku, v první polovině následujícího roku každé 3 měsíce, po 1,5 roce a v dalších letech od primární terapie 1krát za 6 měsíců. Koncentrace nádorového markeru má být dále vyšetřena: před nasazením terapie, po ukončení terapie (podle poločasu markeru, obvykle 3.–4. týden), při změně terapie, dále i při nejasném průběhu nemoci. Při nálezů zvýšené hodnoty se doporučuje v co nejkratší době provést opakování odběru kvůli potvrzení nálezů. Po potvrzení zkrátit intervaly vyšetřování, aby se zjistil případný stoupající trend.

Při hodnocení vyšetření je třeba zvážit další faktory, které by mohly přispět k falešné pozitivitě výsledku (tab. 2 a tab. 3). Jsou to především zvýšené hladiny nádorových markerů v důsledku jejich produkce u nemaligních onemocnění, nebo při poruchách jejich vylučování (zejména při zhoršené funkci jater nebo ledvin). K falešně pozitivním nebo negativním výsledkům imunoanalytických testů mohou přispět heterofilní protilátky (autoimunitní onemocnění nebo lymfotropní virózy) a lidské anti-myší protilátky (HAMA), které se mohou v tělních tekutinách objevit zejména jako důsledek reakce organismu na myší bílkoviny, podané např. za účelem diagnostiky nebo terapie nebo předchozí imunizace pacienta stykem s hlodavci.

Pro většinu nádorových markerů je znám biologický poločas v séru, který je velmi rozdílný (tab. 4), proto je třeba jej při hodnocení změn časového průběhu hladin zvažovat.

Jako signifikantní bývají posuzovány tyto změny hladin nádorových markerů:

a) bez terapie (v klinické remisi) – stoupající trend koncentrace ve třech následných odběrech i v hladinách do cut-off značí recidivu, respektive progresi;

b) během terapie – nárůst o více než 25 % značí progresi onemocnění, pokles více než 50 % parciální remisi (kompletní remise však nemůže být hodnocena pouze pomocí změn v hladinách markerů).

Tab. 1. Solubilní nádorové markery vhodné pro monitorování průběhu choroby a účinnosti terapie

Nádor – lokalizace		Markery základní	Markery doplňkové
Žaludek		CA 72-4, CEA	–
Jícen	horní třetina	SCCA	CYFRA 21-1
	dolní třetina	CA 72-4, CEA	–
Pankreas		CA 19-9, CEA	–
Játra		AFP, CEA	–
	cholangiocelulární	CA 19-9	–
	metastázy	CEA	–
Mléčná žláza		CA 15-3, CEA	TPA/S
Ovarium	nemucinózní	CA 125	TPA/S
	mucinózní	CA 19-9, CA 72-4	CEA
	germinativní	AFP, hCG	–
Cervix	epidermoidní	SCCA	CYFRA 21-1, CEA
	adenokarcinomy	CEA	–
Corpus uteri		CA 125	CEA
Vulva		SCCA	–
Ledviny		TPA/S, CEA	NSE
Močový měchýř		TPA/S	CYFRA 21-1
Prostata		PSA, fPSA	ChgA
Testes	seminomy	hCG, AFP	NSE
	ne seminomy	hCG, AFP	–
Karcinoid		5-hydroxy, 3-indolyloctová kyselina, NSE	–
Štítná žláza	medulární	CT, CEA	NSE
	anaplastické	TPA/S	–
Melanom		NSE, S100beta	TK
Plíce	SCLC	CEA, NSE	TPA/S
	NSCLC	CYFRA 21-1, CEA	SCC
Hlava, krk		SCCA	CYFRA 21-1
CNS	neuroblastomy	NSE	–
	gliomy	CEA	–
	astrocytomy	TK	–
Leukémie		TK, FER, LD	–
Lymfom	hodgkinský	B2M, FER, LD	–
	non-hodgkinský	TK, B2M, LD	–
Mnohočetný myelom		B2M, paraproteiny	–

Tab. 2. Zvýšené hladiny nádorových markerů u nemaligních onemocnění

Nádorový marker	Nemaligní onemocnění	Jiná příčina
ACTH	Cushingův syndrom, Addisonova nemoc	–
AFP	žaterní cirhóza, akutní i chronická hepatitida, zánětlivé procesy plic, ledvin, GIT	těhotenství
B2M	postižení ledvin, chronické záněty, poruchy imunity	–
CA 125	ovariální cysty, záněty adnex, choroby jater, pankreatu, žlučníku, výpotky	těhotenství
CA 15-3	žaterní cirhóza, akutní hepatitida, postižení ledvinových glomerulů	–
CA 19-9	cirhóza jater, cholelitiáza, chronická hepatitida, akutní a chronická pankreatitida, choroby žlučových cest, diabetes	–
CA 72-4	benigní mammární nádory, choroby GIT	–
CEA	zánětlivé choroby jater, ledvin, žaterní cirhóza, pankreatitida	kouření

Nádorový marker	Nemaligní onemocnění	Jiná příčina
CYFRA 21-1	urologický trakt, myomy, ovariální cysty	–
FER	záněty obecně, poruchy metabolismu železa	–
hCG	mola hydatidóza	těhotenství
Chromogranin A	poruchy ledvin a jater	terapie kortikoidy
NSE	plicní a jaterní onemocnění	hemolýza ve vzorku
PSA	benigní hyperplazie, záněty prostaty	mechanické dráždění prostaty
S-100 B	poškození mozku, zlomeniny, záněty	–
SCCA	záněty plic, poruchy ledvin, jater	–
TK	virové infekce, proliferační procesy, B ₁₂ – deficiencie	–
TPA/S	infekční procesy obecně, jaterní cirhóza, pankreatitida	–

Tab. 3. Pozitivita nádorových markerů u benigních onemocnění

Klinický stav		Hladiny markerů se mění		
		často (více než v 30 %)	může se měnit (10–30 %)	ne (u méně než 10 %)
Kouření		CEA	–	–
Vyšetření <i>per rectum</i>		CEA, PSA	CA 72-4, 125, SCC	CA 15 -3, CA 19-9, cytokeratiny
Těhotenství		hCG, AFP, CA 125, 19-9	CA 15-3, TK, cytokeratiny	CEA, SCC
Perniciózní anémie		TK, ferritin	–	ostatní markery
Regenerační procesy spojené s rychlým buněčným růstem		TK, TPS	–	CEA, CA typu, AFP
Infekce	bakteriální celková	TK, TPS	TPA	většina NM
	bakteriální lokální	TK, TPS	většina NM, souvisí s lokalizací	–
	virová	TK	TPS	většina NM
Imunoalterační onemocnění	akutní fáze	TK, TPS	TPA, AFP, CA 125, CA 19-9	–
	stabilizovaný stav		TK	většina NM
Srdeční selhání	bez výpotku a ascitu	CA 125, AFP, B2M	CA 19-9, TPS, TPA	TK, CEA, CA 72-4
	s výpotkem a ascitem	CA 125, TPS, TPA, B2M, CYFRA 21-1	–	–
Výpotek benigní etiologie	pohrudniční dutina	CA 125, TPS, TPA, CYFRA 21-1	–	CEA, TK, CA 15-3
	břišní dutina (ascites)	CA 125, TPS, TPA	CA 19-9, CA 72-4, CYFRA 21-1	CEA, TK, SCC, CA 15-3
Ateroskleróza	–	TPS	CYFRA 21-1	TPA a většina NM
Ledvinné selhání	–	CEA, Chg A, B2M, ferritin, AFP	CA 15-3, SCC, CA19-9, CYFRA 21-1	TK, TPS, TPA
Onemocnění jater a žlučových cest	akutní	CA 19-9, CA 125, AFP	CA 15-3, CEA	TK, TPS, TPA, SCC
	chronické	CA 19 -9, AFP, CA 125	CA 15-3, CEA, ChgA	–
	selhání jater	Chg A, AFP, CA 19-9	CEA, markery CA typu	TK, cytokeratiny
Onemocnění plic	zánětlivé	CEA, CA 19-9	–	–
	benigní nádor	CEA, CA 19-9, CYFRA 21-121.1	–	–
Onemocnění prsu	benigní nádor	CEA, CA 15-3	TPA, CA 19-9, CA 125,	TK, TPS, AFP
Onemocnění střev	zánětlivé	CA 19-9, CA 72-4, AFP, CEA	TK, TPS, TPA, CYFRA 21-1	–
	autoimunní	TK, TPS	AFP, CA 19-9, CA 72-4, CEA, CYFRA 21-1	–
	benigní nádor	CEA, CA 19-9, CA 72-4	–	–

Tab. 4. Biologický poločas nádorových markerů v séru

Marker	Dny	Hodiny
ACTH	–	0,2
AFP	5	–
B2M	–	0,7
hCG	–	1
CA 125	4	–
CA 15-3	7	–
CA 19-9	5	–
CEA	14	–
CT	–	0,2
CYFRA 21-1	–	3
FER	2	–
fPSA	–	7
hCG	1	–
NSE	1	–
P-ACP	–	2
PRL	–	0,3
PSA	2	–
SCCA	–	0,3
TG	2,5	–
TK	2	–
TPA	7	–

5 Charakteristika jednotlivých klinicky významných nádorových markerů a specifické doporučení k jejich používání v klinické praxi

Poznámka: Hodnoty cut-off obsažené v tomto doporučení jsou obvyklými hodnotami používanými klinicky pro detekci rekurence choroby; přes veškerou snahu o metodickou standardizaci se hodnoty cut-off mohou lišit podle užívané metodiky.

5.1 Solubilní nádorové markery

• **CEA (karcinoembryonální antigen):** Jde o onkofetální glykoprotein s vysokým obsahem sacharidů o molekulové hmotnosti 180–200 kDa. Za fyziologických podmínek je CEA produkován ve vyvíjejícím se embryu. V dospělosti je omezeně syntetizován epiteliálními buňkami střevní sliznice, žaludku a bronchů. CEA patří do imunoglobulinové genové rodiny; podílí se pravděpodobně na procesu adheze a metastazování buněk.

Hodnocení: Obvyklá hodnota cut-off je kolem 5,0 µg/l. *Doporučené použití pro klinické účely:* Pro screening i diagnostiku maligního onemocnění nelze CEA použít. CEA produkují karcinomy zažívacího traktu, plic (adenokarcinomy), mléčné žlázy, nádory ženských pohlavních orgánů (mucinózní adenokarcinomy), endometriální nádory i nádory děložního těla, karcinomy močového měchýře, ledvin, diferencované karcinomy prostaty a testikulární teratomy. Předoperační hodnoty

CEA > 40 µg/l jsou charakteristické pro kratší interval bezpříznakového přežití nemocných s karcinomem mléčné žlázy. Na základě předoperačních hodnot lze posoudit možnost radikálního zásahu u kolorektálního karcinomu. Monitorování průběhu onemocnění a odpovědi na léčbu patří k základním využitím CEA. Hodnoty vyšší než 10 µg/l znamenají obvykle progresi maligního procesu. Koncentrace vyšší než 50 µg/l svědčí s vysokou pravděpodobností o jaterních nebo kostních metastázách. Pro nádory zažívacího traktu se obvykle pohybuje senzitivita při návratu onemocnění pro kolorektální karcinom kolem 60 %, pro nádory žaludku je asi 50%. Pokles hodnot CEA po chirurgickém výkonu může poskytnout údaj o úspěšnosti terapie, podobně lze hodnotit efekt chemo- či radioterapie, pokud byly hodnoty před terapií zvýšené.

Zvýšení CEA v séru lze také pozorovat u benigních nebo premaligních lézí, jako jsou jaterní cirhóza, Crohnova choroba, střevní polypy, onemocnění plic, ledvin, žlučníku, pankreatitida, benigní onemocnění prsu, dále u kuřáků a alkoholiků.

• **CA 19-9:** Vyskytuje se jako glykolipid ve tkáni nebo mucin v séru. Obsahuje determinanty lidské krevní skupiny sialyl-Lewis (a). Kolem 5–10 % populace tento antigen netvoří.

Hodnocení: Obvyklá hodnota cut-off je kolem 40 kU/l. *Doporučené použití pro klinické účely:* Pro screening a stanovení diagnózy maligního onemocnění není vhodný, a to ani pro nádory pankreatu, kde dosahuje tento marker vysoké senzitivity (až 70–90%) i výrazně vysokých hodnot v séru (až 10⁶ kU/l). Exponenciální nárůst koncentrací v séru (nad 10⁴ kU/l) je obvykle známkou vzdálených metastáz. Vysokou senzitivitu dosahuje tento marker i podle závažnosti onemocnění u karcinomů kolorekta (18–58%), u cholangiocelulárních karcinomů (22–49%), u nádorů žlučových cest (55–79%) a žaludku (25–60%). Koncentrace CA 19-9 korelují dobře s efektem terapie. Mucinózní karcinomy ovaria mohou taktéž produkovat CA 19-9.

Značně zvýšené hladiny CA19-9 v séru působí cholestáza, ale i benigní a zánětlivá onemocnění žaludku, střeva, pankreatu a jater.

• **AFP (α-1-fetoprotein):** AFP je onkofetální glykoprotein, produkován v embryonálním žloutkovém vaku a ve fetálních játrech. V dospělém zdravém organismu je syntéza AFP omezena na minimum. V séru matky, kam přechází přes placentu, je důležitým ukazatelem fyziologického vývoje těhotenství. Významná je především jeho role transportní (vazba steroidů, některých těžkých kovů, bilirubinu, mastných kyselin, retinoidů, drog, antibiotik apod.)

Hodnocení: Obvyklá hodnota cut-off je kolem 10 µg/l. *Doporučené použití pro klinické účely:* Screening maligního procesu pomocí AFP v séru je vhodný pouze u symptomatických nemocných s jaterní cirhózou nebo podezřením na germinativní nádory varlat (nesestouplé varle, nádory testes u sourozence – dvojčete). Monitorování průběhu onemocnění patří k základním využitím AFP. Pro hepatocelulární karcinom je AFP markerem první volby (senzitivita u neléčeného onemocnění je až 80%). U germinativních nádorů ovariálních i testikulár-

ních je senzitivita rovněž vysoká: pro čisté embryonální nádory dosahuje hodnot až 80 %, u teratomů 20 %, a až 80 % u nádorů žloutkového vaku. Obvykle chybí v seminomech a choriokarcinomech. Expres AFP u nádorů zažívacího traktu je pozorována asi u jedné pětiny nemocných.

Nemaligními příčinami zvýšené hladiny AFP v séru většinou bývají akutní virová i chronická hepatitida, cirhóza jater a těhotenství.

• **hCG (lidský choriový gonadotropin):** Jde o glykoprotein tvořený dvěma rozdílnými podjednotkami: α (14,5 kDa) a β (22,2 kDa). *In vivo* může docházet k disociaci jednotek α a β , β -složka může být dále štěpena na močový gonadotropinový peptid (β -core fragment). *Hodnocení:* Obvyklá hodnota cut-off je kolem 10 IU/l. *Doporučené použití pro klinické účely:* V závislosti na použitém detekčním systému je stanovení specifické pro celkový β -hCG (tj. intaktní hormon-dimer + volná podjednotka β), pro intaktní hCG (dimer bez volné podjednotky β), pro volnou podjednotku β nebo pro β -core fragment (stanovení v moči). Screening maligního procesu pomocí hCG v séru lze provádět u symptomatických osob, např. při podezření na germinativní nádory varlat s retencí varlat v anamnéze. Stanovení má význam pro zhodnocení stadia onemocnění, pro potvrzení histologické charakterizace nádorů testes a choriokarcinomů a pro jejich monitorování. Senzitivita pro neseminomy je asi 50%, pro seminomy 10–20%, pro choriokarcinomy téměř 100%, pro další lokalizace nádorů (pankreas, GIT, plíce, mléčná žláza, ledviny, močový měchýř) je do 20 %.

Zvýšené hladiny hCG v séru mohou způsobovat fyziologické i patologické stavy v těhotenství, myomy a ovariální cysty.

• **CA 15-3:** Jde o antigen polymorfního epiteliálního mucinu (PEM), nazývaný rovněž MUC1. V dospělosti je syntetizován v epiteliálních buňkách vývodu mléčné žlázy, slinných žláz a bronchů. Alternativou stanovení CA 15-3 je stanovení antigenu CA 27-29; jde o detekci odlišného epitopu téhož epiteliálního mucinu (MUC1).

Hodnocení: Obvyklá hodnota cut-off je kolem 35 kU/l. *Doporučené použití pro klinické účely:* Stanovení nelze použít pro screening nemocných s karcinomem prsu a stanovení této diagnózy, vyjma vybrané skupiny pacientů a jejich rodin z indikace genetiky. Koncentrace CA 15-3 koreluje se stadiem onemocnění. Hlavní využití CA 15-3 je v monitorování nemocných s karcinomem prsu. Při 90% specifitě dosahuje senzitivita u neléčených nemocných pouze 20–40 %, u metastazujících nádorů až 80%. Relaps onemocnění bývá charakterizován senzitivitou CA 15-3 dosahující 60–90 %. Jeho „lead time“ umožňuje předpovědět návrat onemocnění s předstihem několika měsíců před některými zobrazovacími metodami. Dynamika změn po terapii obvykle koreluje s terapeutickým efektem.

Nemaligní onemocnění, zvyšující hladinu CA 15-3 v séru, zahrnují benigní onemocnění prsu, benigní onemocnění trávicího ústrojí, jaterní cirhózu, akutní a chronickou hepatitidu, chronickou renální insuficienci, chronickou bronchitidu či pneumonie.

• **CA 125:** Jde o heterogenní glykoprotein s vysokým obsahem sacharidů. Je produkován fetálními epiteliálními tkáněmi coelomového původu. V dospělém věku může být omezeně syntetizován v normálním epitelu tkáně vejcovodů, bronchů, endometria, cervixu, ale i v mezotelu pleury, perikardu a peritonea.

Hodnocení: Obvyklá hodnota cut-off je kolem 35 kU/l.

Doporučené použití pro klinické účely: CA 125 je exprimován u 80 % karcinomů ovarií serózního (nemucinózního) typu. Senzitivita v dalších gynekologických nádorech je nižší. Produkce CA125 u karcinomů mléčné žlázy, pankreatu, plic, žlučových cest reflektuje obvykle postižení pleury a peritonea. Zvýšená hladina CA 125 byla prokázána u hepatocelulárního karcinomu. Screening CA 125 v séru nemocných s karcinomem ovarií je prováděn pouze v případě rodinné predispozice. Stanovení CA 125 je vhodné pro potvrzení stadia choroby. Nárůst koncentrace CA 125 může předcházet klinickou diagnózu o 1–8 měsíců. Po odstranění primárního tumoru klesá koncentrace CA 125 o 75–90 % během prvního týdne, do 2–3 týdnů se hodnoty normalizují. Přetrvávající vysoké hodnoty mohou být indikací k „second look“ operaci.

Zvýšené hladiny CA 125 v séru způsobené nemaligním onemocněním obvykle zahrnují chronická onemocnění jater, peritonitidu, benigní onemocnění ovarií a endometria, leiomyom nebo selhání ledvin.

• **PSA (prostatický specifický antigen), fPSA (volná frakce PSA):** PSA je serinová proteináza umožňující zkapalnění seminální tekutiny, čímž usnadňuje pohyb spermií. PSA má enzymovou aktivitu chymotrypsinu. V séru je PSA inaktivován vazbou na α_1 -antichymotrypsin, méně na α_2 -makroglobulin. Určitý podíl PSA v séru se vyskytuje ve volné podobě.

Hodnocení: Hodnoty cut-off se mění v závislosti na věku – do 50 let = 2,5 μ g/l, do 60 let = 3,5 μ g/l, do 70 let = 4,5 μ g/l, starší = 6,5 μ g/l. Frakce fPSA/PSA bývá u maligního nádoru 0–15 %, hraniční hodnoty jsou 15–20 %, u benigního onemocnění nad 20 %.

Doporučené použití pro klinické účely: Význam screeningu karcinomu prostaty pomocí sérového PSA u asymptomatických mužů je diskutabilní, lze jej provádět u starších mužů se symptomy poruch močových cest, eventuálně s rodinnou zátěží. Pro odlišení benigní hyperplazie od karcinomu se stanovuje poměr volného a celkového PSA (u benigních hyperplazií je vyšší – nad 20 %). Zvýšení PSA o více než 0,75 μ g/l ročně ve třech po sobě jdoucích vyšetřeních znamená 90% pravděpodobnost karcinomu prostaty. Hladiny PSA nad 30 μ g/l mohou signalizovat i vzdálenější metastázy. Přetrvávající zvýšené koncentrace v séru po radikální prostatektomii znamenají buď přítomnost zbytkové choroby, či lokální návrat. Monitorování má význam rovněž při terapii – pokles PSA obvykle koreluje s délkou přežití.

Příčinou zvýšené hladiny PSA v séru bývá též předchozí digitální rektální vyšetření prostaty, předchozí biopsie prostaty, transuretrální resekce nebo jiné mechanické dráždění prostaty. Z nemaligních onemocnění je zvýšení pozorováno u hyperplazie prostaty nebo prostatitidy.

• **CA 72-4:** Antigen CA 72-4 (Tumor-asociovaný antigen, TAG 72) je definovaný jako epitop mucinu reagující se dvěma monoklonálními protilátkami. Za fyziologického stavu jej produkuje vyvíjející se plod v žaludku, jícnu a pankreatu.

Hodnocení: Obvyklá hodnota cut-off je kolem 7,0 kU/l.

Doporučené použití pro klinické účely: CA 72-4 se používá pro monitorování maligních nádorů horního GIT a mucinového typu ovariálního karcinomu. CA 72-4 je nevhodný pro screening a stanovení diagnózy maligního procesu horního GIT. Jeho hladina koreluje s přítomností vzdálených metastáz. Užívá se k monitorování průběhu onemocnění především u karcinomu žaludku. Příčiny zvýšení CA72-4 v séru u nemaligních chorob obvykle zahrnují jaterní cirhózu, akutní pankreatitidu, chronickou bronchitidu, vředovou chorobu žaludku a zánětlivá onemocnění GIT.

• **S-100 beta:** Vyskytuje se jako homo- nebo heterodimer tvořený z podjednotek α a β . S-100 beta protein byl poprvé popsán v centrálním nervovém systému. V nervové tkáni (v gliálních a Schwanových buňkách) se nachází především S-100 β - β dimer. Složení (α - α) mají např. příčně pruhované svaly.

Hodnocení: Obvyklá hodnota cut-off je kolem 0,1 μ g/l.

Doporučené použití pro klinické účely: Melanomy jsou charakteristické obsahem β -podjednotky tohoto proteinu. Přítomnost této formy S-100 beta v séru svědčí pro jeho invazivitu. V dysplastických névech je naopak prokazována především α -podjednotka. Pro screening a diagnostiku se neužívá, je vhodný pro monitorování nemocných s maligním melanomem. U metastatického onemocnění bývají přítomny vysoké koncentrace tohoto markeru, rovněž senzitivita při metastatickém procesu je až 80%. Koncentrace měřené před primární terapií mají vysokou prognostickou hodnotu. Pozitivní hodnoty lze nalézt i u mozkových maligních nádorů ektodermálního původu. Zvýšené hladiny S-100 beta v séru mohou být způsobeny i akutním poškozením mozku, kostními zlomeninami, zánětlivým a infekčním onemocněním.

• **NSE (neuron-specifická enoláza):** Jde o izoenzym enolázy (2-fosfo-D-glycerát hydrolyáza, EC 4.2.1.11), který katalyzuje přeměnu 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát. Za fyziologického stavu jej produkuje nervová a plicní tkáň plodu, v dospělosti je jeho výskyt v normálním stavu vázán především na neurony.

Hodnocení: Obvyklá hodnota cut-off je kolem 15 μ g/l.

Doporučené použití pro klinické účely: Vzhledem k obsahu NSE v červených krvinkách a destičkách je třeba provést oddělení krevních elementů do jedné hodiny od odběru. NSE není vhodná pro screening a stanovení diagnózy maligního procesu. Pro pacienty s neuroblastomy a malobuněčným karcinomem plic (SCLC) má stanovení NSE prognostický význam. Zvýšené hodnoty NSE u neléčených nemocných se SCLC se mohou vyskytovat až u 80 % případů. Monitorování průběhu onemocnění je vhodné především u SCLC, neuroblastomů, meduloblastomů, retinoblastomů, dále apudomů (karcinoidů, feochromocytomů), u nádorů ledvin, eventuálně i u seminomů, melanomu a prostaty. Nejvyšší hodnoty bývají popisovány u dobře diferencovaných

vaných ganglioneuroblastomů a ganglioneurómů. Senzitivita při rozsevu onemocnění u SCLC bývá až 80%. Příčiny zvýšení NSE v séru nemaligních lézí zahrnují plicní onemocnění nebo jaterní choroby.

• **Nádorový izoenzym pyruvátkinázy (Tumor M2-PK):**

Izoenzym pyruvátkinázy (Tumor M2-PK) patří mezi klíčové enzymy glykolýzy (E.C.2.7.1.40). Nádorový izoenzym existuje jako homodimer na rozdíl od nemaligních forem, které tvoří homotetramery. Pro stanovení je nutno použít EDTA nebo citrátovou plazmu z důvodu možného uvolnění tohoto izoenzymu z lymfocytů.

Hodnocení: Obvyklá hodnota cut-off je kolem 30 kU/l.

Doporučené použití pro klinické účely: Jde o marker nový, existuje o něm relativně málo dat v literatuře. O použití tohoto markeru lze uvažovat u těch lokalizací onemocnění, kde nejsou jiné vhodné solubilní markery k dispozici. Tumor M2-pyruvátkináza byla prokázána u nemocných s karcinomem varlat, ledvin, plic, prsu, pankreatu a tlustého střeva. Příčiny zvýšené hladiny Tumor M2-PK v séru zahrnují zánětlivá onemocnění, virové infekce nebo poruchy ledvin.

• **SCCA (antigen skvamózních buněk):** Definován je

jako složka směsného antigenu TA-4, prokázánem v séru u pacientek s karcinomem děložního čípku. Byly identifikovány dva homologní proteiny SCC1 a SCC2. Tyto antigeny byly charakterizovány jako serin proteinázové inhibitory, tzv. serpiny. Marker je výrazně citlivý na kontaminaci slinami nebo potem v preanalytické fázi.

Hodnocení: Obvyklá hodnota cut-off je kolem 1,5 μ g/l.

Doporučené použití pro klinické účely: Pro screening a stanovení diagnózy se neužívá. Vysoké hodnoty u neléčených nemocných s karcinomem cervixu jsou prognosticky významné pro odhad dalšího vývoje onemocnění. Monitorování průběhu onemocnění pomocí SCCA se provádí především u pacientů s nádory orofaciální oblasti, epidermoidních nádorů plic, děložního čípku, těla dělohy, endometria, vulvy a vaginy.

Příčiny zvýšení SCCA v séru u nemaligních lézí zahrnují nemaligní gynekologická a plicní onemocnění nebo jaterní choroby.

• **CYFRA 21-1 (fragment cytokeratinu 19):** Jde

o solubilní fragment cytokeratinu 19. Předpokládá se, že jeho výskyt v séru nemocných s maligními nádory může souviset se smrtí buňky apoptózou či nekrotózou. Vzhledem ke specifickému výskytu tohoto cytokeratinu v epiteliálních buňkách skvamózního (epidermoidního) typu má CYFRA 21-1 vyšší orgánovou specifitu než ostatní cytokeratinové markery TPA nebo TPS.

Hodnocení: Obvyklá hodnota cut-off je kolem 3,3 μ g/l.

Doporučené použití pro klinické účely: Pro screening a stanovení diagnózy maligního procesu nelze toto vyšetření použít. Jeho hladina obvykle koreluje se stadiem onemocnění. Monitorování průběhu onemocnění a především monitorování úspěšnosti terapie je hlavní oblastí využití tohoto markeru. Senzitivita u epidermoidních karcinomů plic se pohybuje kolem 55 %, u velkobuněčných karcinomů a adenokarcinomů plic je nižší (35 a 28%). Význam má rovněž pro sledování nemocných s karcinomem močového měchýře (senzi-

tivita asi 30%) a epidermoidních nádorů cervixu (spolu s SCCA) a nádorů oblasti hlavy a krku.

Příčin zvýšení hladiny CYFRA 21-1 z nemaligních příčin je celá řada a zahrnují jaterní cirhózu, chronické onemocnění ledvin, astma, infekce respiračního traktu a další.

• **TPA, TPS (tkáňový polypeptidový antigen, tkáňový polypeptidový specifický antigen):** TPA je polypeptid ze solubilních fragmentů cytokeratinů typu středních filament (cytokeratin 8, 18, a 19). Antigen s velice podobnou charakteristikou, definovaný na podkladě reaktivity s jinou monoklonální protilátkou, byl nazván TPS (tkáňový polypeptidový specifický antigen odpovídající cytokeratinu 18).

Hodnocení: Obvyklá hodnota cut-off TPS je kolem 140 U/l. *Doporučené použití pro klinické účely:* Jde o velmi nespecifické nádorové markery, jejichž užití v klinické praxi poslední dobou klesá. TPA/S měl být „univerzálním“ nádorovým markerem vhodným především pro monitorování a hodnocení účinnosti terapie. Je markerem s nejvyšší senzitivitou pro sledování nemocných s karcinomem močového měchýře. Vyšetření tohoto markeru nelze použít pro screening, diagnózu a staging onemocnění. Dále se užívá pro monitorování nemocných s nádory prsu, plic, GIT a ledvin. Dynamika jeho změn při terapii je obvykle rychlejší než u markerů diferenciačního typu.

Nespecificky je TPA/S v séru zvýšen při některých onemocněních jater (cirhóza, hepatitida), rovněž tak u infekčních onemocnění.

• **TK (thymidinkináza):** TK patří k enzymům syntézy DNA, charakteristickým pro proliferující tkáň.

Jde o ATP – thymidin-5-fosfotransferázu (EC 2.7.1.21) – která existuje v eukaryotických buňkách ve dvou izoenzymech: TK1 (fetální TK) a TK2 („dospělá“ TK). Fetální izoenzym je vázán na proces buněčného dělení a je lokalizován v cytoplasmě. Izoenzym TK2 je naopak přítomen v mitochondriích a jeho aktivita je stabilní v průběhu celého buněčného cyklu. TK katalyzuje přeměnu thymidinu na thymidinmonofosfát, čímž je umožněna syntéza DNA náhradní cestou. Za fyziologických podmínek je TK intenzivně syntetizována především v játrech během vývoje plodu, po porodu se syntéza zpomaluje. V séru převažuje fetální forma (95 % z celkového množství).

Hodnocení: Obvyklá hodnota cut-off je kolem 9 U/l.

Doporučené použití pro klinické účely: Některá cytostatika blokují základní („de novo“) syntézu DNA (metotrexát, 5-fluorouracil); následně je stimulována aktivita enzymů náhradní cesty a TK vykazuje falešnou pozitivitu. Vyšetření je třeba provádět před nasazením uvedené chemoterapie.

Pro screening a stanovení diagnózy nelze stanovení TK použít. U hematologických malignit (především u akutní leukémie nebo nehodgkinských lymfomů) koreluje aktivita TK se závažností onemocnění. Monitorování průběhu onemocnění a úspěšnosti terapie je hlavní oblastí využití tohoto markeru. Zvýšení sérové TK bývá pozorováno rovněž u maligního melanomu, nádorů štítné žlázy, popř. dalších solidních nádorů.

Zvýšení hladiny TK v séru z nemaligních příčin zahrnuje respirační viroinfekty s lymfocytární aktivací,

zánětlivá onemocnění plic a trávicího ústrojí, infekce EB virem, cytomegaloviry nebo herpesviry a revmatická onemocnění.

• **Chromogranin A (CgA):** Chromogranin A (CgA) je kyselý glykoprotein vyskytující se v sekrečních granulích normálních i neoplastických neuroendokrinních tkáních.

Hodnocení: Obvyklá hodnota cut-off je kolem 35 µg/l.

Doporučené použití pro klinické účely: CgA vykazuje nejvyšší senzitivitu u nemocných s neuroendokrinními malignitami při srovnání s dosud užívanými metodami stanovení NSE nebo 5-hydroxyindolactové kyseliny v moči. Senzitivita průkazu návratu choroby pro karcinoidy se pohybuje kolem 70–90 %. CgA vykazuje korelaci se změnami odpovídajícími vývoji onemocnění (progrese, stabilizace, kompletní remise). Cirkulující CgA byl prokázán i u sporadických gastro-entero-pankreatických neuroendokrinních tumorů i u dědičných mnohočetných endokrinních neoplazií typu 1 (MEN), u dětských neuroblastomů i u neuroendokrinní diferenciaci karcinomu prostaty nereagujících na hormonální léčbu.

Zvýšené hladiny chromograninu A v séru či plazmě najdeme při terapii kortikoidy, poruchách ledvin a jater.

• **β₂-mikroglobulin (B₂M):** B₂M tvoří extracelulární doménu lidského leukocytárního antigenu HLA I. třídy. Je přítomen téměř ve všech buňkách kromě eryocytů a trofoblastických buněk.

Hodnocení: Obvyklá hodnota cut-off je kolem 2,4 mg/l.

Doporučené použití pro klinické účely: Stanovení nelze použít pro screening a diagnostiku maligního onemocnění. B₂M je zvýšen u systémového onemocnění B-lymfocytárního systému, u mnohočetného myelomu, chronické lymfocytární leukémie a nehodgkinských lymfomů B-lymfocytárního původu. K určitému zvýšení B₂M v případě rozsevu onemocnění dochází i u solidních karcinomů.

Zvýšené hladiny B₂M v séru se vyskytují zejména u poruch funkce ledvin a chronických zánětlivých autoimunitních onemocnění.

• **Ferritin (FER):** Jde o protein podílející se na regulaci homeostázy železa. Za fyziologických podmínek je FER produkován retikuloendoteliálními buňkami sleziny, jater a kostní dřeně.

Hodnocení: Hodnota cut-off pro premenopauzální ženy je 150 µg/l, pro muže a postmenopauzální ženy je 400 µg/l.

Doporučené použití pro klinické účely: Jeho význam jako nádorového markeru v poslední době klesá. Koncentrace FER v séru jsou závislé na věku a pohlaví. Snížení může indikovat anémii z nedostatku železa. U hematologických malignit koreluje obvykle jeho hladina se závažností onemocnění. Monitorování průběhu onemocnění a především monitorování terapie je hlavní oblastí využití tohoto markeru. Ferritin je zvýšený především u akutní myeloblastické leukémie, hodgkinského i nehodgkinského lymfomu a mnohočetného myelomu, nespecifické zvýšení provází nádory mammy, maligní melanomy a testikulární nádory.

Nemaligními příčinami zvýšení hladiny ferritinu v séru jsou zejména akutní onemocnění nebo poruchy meta-

bolismu železa (hemochromatóza nebo předávkování železem), nespecifické jaterní léze.

• **LD (laktátdehydrogenáza):** Jde o enzym tvořený dvěma rozličnými polypeptidovými řetězci, které formují 5 izoenzymů. Na zvýšení LD u maligních onemocnění se podílí zejména izoenzym 1 a 2, u solidních nádorů i ostatní izoenzymy.

Hodnocení: Není jednotná hladina cut-off; nález je informativní při posouzení změny katalytické koncentrace LD mezi dvěma časově odlišenými odběry. U dětí je hodnota LD vyšší. Laboratořím se doporučuje používat jako hodnotu cut-off hodnotu horní meze jejich vlastního referenčního intervalu.

Doporučené použití pro klinické účely: Je vhodným doplňkovým markerem zejména pro monitorování nemocných s diferencovanými lymfocytárními i histiocytárními typy ne Hodgkinsonských lymfomů, leukémií, ale i solidních nádorů (testikulárních a jiných).

• **Kalcitonin:** Za normálních okolností je produkován C-buňkami (tj. parafolikulárními buňkami) štítné žlázy. Kalcitonin je odštěpen z velkého prekurzorového proteinu prokalcitoninu před sekrecí do extracelulárního prostředí. Stimulem pro sekreci je hyperkalcémie.

Hodnocení: Obvyklá hodnota cut-off je kolem 19 ng/l.

Doporučené použití pro klinické účely: Diagnosticky se stanovení kalcitoninu používá zejména u nádorů C-buněk štítné žlázy, tzn. při medulárním karcinomu štítné žlázy, včetně výskytu tohoto tumoru v rámci MEN syndromu. Stanovení kalcitoninu se rovněž využívá při pentagastrinovém testu, kdy osoby s medulárním karcinomem tyreoidy mají po aplikaci pentagastrinu větší vzestup kalcitoninu než osoby zdravé.

• **Tyreoglobulin (TG):** Tyreoglobulin je glykoprotein, obsahující jód a asi 10 % sacharidů. Je tvořen 2 identickými podjednotkami. Molekula TG obsahuje přibližně 110 tyrozylových zbytků, které jsou jodovány do různých stupňů (mono-, di-, trijodtyroninu a tyroxinu) před jejich odštěpením do extracelulární tekutiny. Při stanovení tyreoglobulinu je třeba napřed zjistit přítomnost autoprotilátek proti TG, jež mohou způsobit falešně negativní výsledky.

Hodnocení: Obvyklá hodnota cut-off v závislosti na použité metodě je kolem 33 µg/l.

Doporučené použití pro klinické účely: Patologicky zvýšené hladiny TG jsou charakteristické pro různé maligní onemocnění štítné žlázy, především dobře diferencovaný folikulární a papilární karcinom. Metoda není vhodná pro screening a diagnostiku, ale pro monitorování průběhu onemocnění.

Zvýšené hladiny TG v séru nalezneme u Gravesovy-Basedowovy choroby, eufunkční nodózní strumy a zánětů štítné žlázy.

• **Katecholaminy a metanefriny:** Jedná se o společný název pro dopamin, noradrenalin a adrenalin a jejich metabolity. Z chemického hlediska jde o alkylaminderiváty o-dihydroxybenzenu (pyrokatecholu). Jsou syntetizovány hydroxylací z aminokyseliny tyrozinu. V organismu působí jako hormony a neurotransmitery. *Hodnocení:* Závisí na konkrétním analytu, metodě a analyzovaném materiálu; indukující lékař se řídí hodnotami laboratoře, kam odeslal materiál k vyšetření.

Doporučené použití pro klinické účely: Nevhodné pro screening maligního procesu, avšak mají místo v primární nebo diferenciální diagnostice možné maligní léze, jako např. hormonálně aktivních neuroektodermálních tumorů.

• **ACTH a ACTH-like substance:** Kortikotropní hormon (ACTH, adrenokortikotropin) je jednoduchý polypeptid o 39 aminokyselinách. Sekvence prvních 24 aminokyselin je dostačující pro biologickou aktivitu hormonu. ACTH je syntetizován v bazofilních buňkách přední hypofýzy. Pro toto stanovení je vzhledem k cirkadiánnímu rytmu třeba provést odběr ráno mezi 06:00–10:00 hodinou do předchlazené zkumavky s EDTA (jako na pro krevní obraz), zkumavka se bezprostředně stočí v chlazené centrifuze. Získaná plazma se oddělí a zamrazí, v tomto stavu ji lze odeslat k analýze.

Hodnocení: Referenční rozmezí je obvykle 10 až 60 ng/l; jde o fyziologicky se vyskytující hormon, není proto definována hodnota cut-off pro návrat choroby.

Doporučené použití pro klinické účely: Stanovení plazmatického ACTH je užitečné při studiích abnormalit osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny, a to jak při odhalování příčiny nadměrné produkce kortizolu (Cushingův syndrom), tak i jeho nedostatečné sekrece (např. Addisonova nemoc). Stanovení může být použito rovněž při výskytu neuroendokrinních nádorů, např. u malobuněčného plicního karcinomu, kde se často podílí na paraneoplastických jevech.

• **Monoklonální imunoglobuliny:** Tyto abnormální imunoglobuliny, používá se i termín paraproteiny, jsou produkovány proliferujícím klonem plazmatických buněk, případně B lymfocytů. Volné lehké řetězce přecházejí do moče glomerulární filtrací jako tzv. Bence-Jonesova bílkovina, jež byla historicky prvním solubilním nádorovým markerem.

Hodnocení: Screening a kvantifikace monoklonálních imunoglobulinů se provádí pomocí elektroforézy sérových bílkovin. Typ nově zachyceného monoklonálního proteinu se určuje pomocí imunofixace; identifikuje se těžký řetězec (IgG, IgA, IgM, specializované laboratoře IgD, popř. IgE) a typ lehkého řetězce (kappa či lambda). Monoklonální proteiny se mohou vyskytovat ve formě celých imunoglobulinů, lehkých řetězců či méně často těžkých řetězců. Kvantifikaci paraproteinu a jeho typ laboratoř poskytuje lékař spolu se slovní interpretací nálezu. Za výrazné zvýšení či snížení hladiny monoklonálního proteinu se považuje změna o více než 10 g/l. Změna do 5 g/l se považuje za nevýznamnou.

Doporučené použití pro klinické účely: Stanovení monoklonálního imunoglobulinu je hlavní indikací elektroforézy sérových bílkovin. Příčinami výskytu monoklonálních proteinů v séru či moči jsou mnohočetný myelom (nejčastěji IgG a IgA), Waldenstromova makroglobulinémie (IgM, více než 30 g/l), jiná B lymfoproliferace (některé lymfomy či chronická lymfocytární leukémie), amyloidóza, tzv. MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance) zahrnující idiopatický benigní výskyt (zpravidla do 10 g/l, ve vyšším věku) či preneoplastický výskyt paraproteinů, maligní tumory (klonální produkce proteinů), lymfotropní virózy (poly- až oligoklonální přechodná lymfoproliferace). Zvýšená bílkovina v moči

při vyloučení jiných příčin je indikací k elektroforéze moči. Při vyšetření moči na bílkovinu pomocí testáčnických proužků pracujících na principu tzv. proteinové chyby indikátoru je třeba pamatovat na to, že výsledek může být falešně negativní v přítomnosti globulinů, tedy i jejich lehkých řetězců. Zvýšené hodnoty imunoglobulinů v séru při vyloučení jiných příčin jsou indikací k elektroforéze sérových bílkovin. Pro monitorování odpovědi na léčbu u myelomu nebo plazmocytomu se vyšetření séra a moče provádí každé 3 měsíce; po vymizení paraproteinu pak follow-up každých 6–12 měsíců, jeho nevymizení po léčbě ukazuje na reziduální chorobu. Záchyt paraproteinu v séru je vhodné doplnit vyšetřením moči a naopak vyšetření opakovat v kontextu nálezu a klinického stavu. U pacientů mladších 50 let se doporučuje sledování dynamiky množství monoklonálního imunoglobulinu každé 3 měsíce, ve vyšším věku pak ročně.

5. 2 Markery kostního postižení skeletu při maligním onemocnění

• **P1NP (N-terminální propeptid prokolagenu typu 1):** Prokolagen typu 1 je syntetizován fibroblasty a osteoklasty a je složen z N-terminálních a C-terminálních propeptidů. Při konverzi prokolagenu na kolagen jsou tyto propeptidy štěpeny specifickými proteázami a následně jsou začleněny do matrix kostí. Stanovení P1NP je využíváno při léčbě osteoporózy a diagnostice kostního rozsevu solidních tumorů a mnohočetného myelomu.

Hodnocení: Obvyklá hodnota cut-off pro maligní kostní lézi je u mužů do 65 µg/l, u žen do 74 µg/l.

Doporučené použití pro klinické účely: P1NP (prokolagen typu 1 N-terminální propeptid) spolu s β-CTX (β-CrossLaps, C-terminální telopeptid), jsou doporučovány v diagnostice kostního rozsevu i hodnocení efektu terapie u různých solidních tumorů, nejčastěji karcinomu prostaty, zejména v terapii bisfosfonáty. Je vhodným markerem jak pro monitorování anabolické terapie (teriparitid, stroncium ranelát), tak také pro antiresorpční terapii (bisfosfonáty, kalcitonin, HRT). V prvním případě by úspěšná léčba měla být doprovázena 40% a vyšším zvýšením hladin P1NP oproti výchozí hodnotě u sledovaného pacienta. Naopak v případě antiresorpční léčby by mělo dojít k více než 40% poklesu hodnot oproti bazální hladině P1NP (IOF – International Osteoporosis Foundation, doporučuje tento analyt pro monitorování antiresorpční léčby). Doporučený interval monitorování je 6 měsíců.

• **C-Telopeptid kolagenu typu I (ICTP):** ICTP je koncová, nehelikální část kolagenu typu I. Jde o části peptidových řetězců, spojených pomocí vazeb (cross-links). Vylučuje se ledvinami, jejichž zhoršená funkce (filtrace pod 50 ml/min) ovlivňuje sérovou koncentraci ICTP.

Hodnocení: Obvyklá hodnota cut-off je kolem 5,3 µg/l.

Doporučené použití pro klinické účely: Senzitivita tohoto markeru pro osteolytické metastázy se pohybuje mezi 70–80 % při 90% specifitě vyšetření. U metastáz karcinomu prostaty bývá udávána senzitivita ICTP o něco nižší (převažující typ kostních metastáz je osteoplastický, převažuje tedy novotvorba kosti). Z nemaligních procesů je ICTP zvýšen u revmatoidní

artritidy, imobilizace pacienta a onemocnění ledvin. Doporučený interval monitorování je 6 měsíců.

5. 3 Tkáňové markery

• **Estrogenový receptor a progesteronový receptor:** Steroidní receptory jsou doposud nejvýznamnějšími prognostickými markery karcinomu prsu. Prokazují se v homogenátu nádorové tkáně kvantitativní imunanalýzou, ligandovou analýzou nebo dnes nejčastěji imunohistochemicky.

Hodnocení: Pomocí imunohistochemie se hodnotí procento pozitivita vyšetřované nádorové tkáně, pomocí ELISA je hodnota cut-off pro oba receptory do 15 fmol/mg proteinu.

Doporučené použití pro klinické účely: Jejich pozitivita je indikací k terapii antiestrogeny. Vypovídá o větší diferenciaci nádorových buněk, menší invazivitě a lepší prognóze onemocnění. Stanovují se standardně u karcinomu prsu.

• **Amplifikace Her2:** Produkt genu HER2/neu (erbB2) je transmembránový receptor s tyrozin kinázovou aktivitou. Gen je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 17. Pomocí FISH se určuje amplifikace genu vzhledem k centromerickému markeru, pomocí imunohistochemie se určuje exprese již syntetizovaného proteinu na membráně vyšetřované nádorové tkáně. Extracelulární doménou tohoto receptoru se uvolňuje do krve, kde je detekovatelná pomocí kvantitativního testu ELISA.

Hodnocení: U metody FISH se hodnotí pozitivita jako počet kopií vzhledem k centromerickému markeru, pomocí imunohistochemie se hodnotí membránová pozitivita proteinu.

Doporučené použití pro klinické účely: Overexprese HER2/neu je důležitým prognostickým a prediktivním faktorem invazivního karcinomu mléčné žlázy, je asociovaná s horší prognózou onemocnění. U pacientek s prokázanou amplifikací genu HER2/neu lze využít léčbu preparátem trastuzumab, monoklonální protilátkou proti extracelulární doméně proteinu HER-2/neu. Měření koncentrace extracelulární domény v séru se zatím jako prognostický nebo prediktivní marker nedoporučuje.

• **Receptor pro EGF:** Řada maligních procesů exprikuje ve zvýšené míře receptory genové rodiny epidermálních růstových faktorů. Stanovení overexprese se provádí imunohistochemicky na vzorku nádorové tkáně.

Hodnocení: Hodnotí se pozitivita pomocí imunohistochemie.

Doporučené použití pro klinické účely: V případě pozitivita nálezu se uvažuje o použití biologické léčby preparáty na bázi inhibitorů EGFR, jako např. erlotinib.

• **DNA ploidie:** U nádorových buněk je možné pozorovat odchylky od normálního počtu chromozomů. Aneuploidii je možné stanovit na základě cytometrického vyšetření obsahu DNA v nádorové tkáni. Takto je možné vyšetřovat čerstvou, zamraženou nebo parafínovanou tkáň. DNA se barví propidium iodidem a analyzuje na průtokovém cytometru.

Hodnocení: Hodnotí se zastoupení buněk v G1/G0 fázi (2n), v G2/M fázi (4n) a buněk syntetizujících DNA v S-fázi,

Tab. 5. Požadavky na kvalitu při validaci metod, vnitřní a externí kontrole kvality podle doporučení NACB

Požadavky	Doporučení	Komentáře/příklady
Validace metod		
Dobře charakterizované metody	Před uvedením do klinické praxe musí být imunochemické i imunohistochemické metody validovány podle definovaného a dobře popsaného protokolu, který splňuje požadavky zákonných doporučení (FDA v USA, CE v EU).	Je nezbytné, aby metody byly validovány před jejich zavedením, aby se zamezilo zavádějícím informacím jak v rutinní klinické praxi, tak v odborné literatuře.
	Imunohistochemické metody by měly být zvlášť pečlivě popsány v případě, že není dostupný vysoce kvalitní referenční materiál.	Například mohou být použity tkáňové řezy s rozdílným množstvím nádorového markeru.
Vnitřní kontrola kvality		
Reprodukovatelnost	Intra-assay variabilita < 5%; inter-assay variabilita < 10%.	Ruční a/nebo výzkumné metody mohou mít nižší přesnost, ale výsledky EGC naznačují, že tyto hranice jsou běžně dostupné pro většinu analytů.
Nastavení objektivních kritérií pro schválení metody	Limity pro akceptovatelnost metody by měly být předem definovány, preferována jsou logická kritéria založená na Westgardových pravidlech.	Výsledky vnitřní kontroly kvality mají být zaznamenávány a kontrolovány před uvolněním výsledků pro lékaře.
Vhodný počet IQC vzorků		Více vzorků IQC zahrnutých do jednoho cyklu analýzy umožňuje identifikaci nevhodné analýzy a potvrzuje možnost využití výsledku pro klinické účely.
Vzorky velmi podobné patientským sérum	Nejméně jeden sérový vzorek z nezávislého zdroje by měl být pro kontrolu matrix zahrnut do kontrolního materiálu, který je poskytován výrobcem reagensů.	Kontroly v soupravách mohou budít přehnaně dobrý dojem ze stanovení, zvlášť pokud jsou připraveny přidavkem standardu k umělé matrix.
Vzorky IQC užívat v koncentracích vhodných pro klinické aplikace	Negativní a slabě pozitivní kontroly by měly být zahrnuty pro všechny TM. Mělo by být pokryto i široké koncentrační rozmezí a vysoké vzorky zařazovat ke kontrole správnosti ředění.	U vyšetření, kde je důležitá určitá rozhodovací hladina (PSA, 4 µg/l; AFP, 5-8 kU/l; hCG, 5 U/l), je třeba zařazovat vzorky IQC blízko těchto hladin.
Externí kontrola kvality		
Vzorky s vhodnou koncentrací analytu	Koncentrace by měla pokrýt pracovní rozmezí.	Distribuce vzorků s vysokou koncentrací analytu ke kontrole linearity ředění, doporučuje se použít i vzorky s nulovou hladinou analytu ke kontrole spodní hranice rozmezí (např. AFP, hCG).
Vzorky co nejpodobnější patientskému séru	Vzorky by měly být ideálně připraveny z autentických patientských sér, která mohou být vzhledem k vysoké hladině TM ředěna běžným sérovým poolem.	Kontrolní vzorky připravené spikováním čištěným analytem do základního sérového poolu zajistí dobré výsledky při srovnání mezi metodami (např. pro CEA je průměrný CV 14% a 20% pro pool obsahující séra pacientů).
Vzorky stabilní při transportu	Doklad o stabilitě vzorku by měl být k dispozici.	Stabilita v horkém klimatu je významnější u FPSA a hCG, ale vhodná data by měla být k dispozici pro všechny TM.

kteří je ukazatelem rychlejšího růstu nádorové populace. V některých případech je možné zachytit klon nádorových buněk, který má aneuploidní počet chromozomů. Toto vyšetření slouží k doplnění nálezu patologa/histologa. *Doporučené použití pro klinické účely:* Aneuploidie a tetraploidie koreluje s horší prognózou u karcinomu prostaty. Aneuploidie je také asociována s kratším přežitím u karcinomu střeva a mozkových nádorů.

5. 4 Cirkulující buněčné elementy

• **Cirkulující nádorové buňky:** Maligní buňky cirkulují v periferní krvi pacientů se solidními nádory. Je možné je detekovat na základě přítomnosti nukleových kyselin; stanovení na základě průkazu DNA je vhodné především u nádorů se specifickými genetickými abnormali-

tami (detekce fúzních genů, mutace Ras, či p53) častěji se provádí stanovení na základě qrt-PCR mRNA, kdy je cílový transkript exprimován specificky v nádorových buňkách (gen pro CEA, AFP, tyrozinázu).

Hodnocení: Cirkulující nádorové buňky je možné detekovat metodami molekulární biologie a pomocí průtokové cytometrie, většinou na základě exprese povrchových znaků epiteliálních buněk nebo adhezivních molekul (EpCAM). Před touto metodou je možné předřadit koncentrační krok založený na izolaci buněk pomocí paramagnetických částic.

Doporučené použití pro klinické účely: Jde o postupy nové, vhodné spíše pro specializovaná pracoviště. Množství nádorových buněk cirkulujících v periferní krvi se zdá být prognostickým faktorem a ukazatelem

progrese a rozsahu onemocnění, především u melanomu, karcinomu prsu, prostaty a kolorekta.

5.5 Markery angiogeneze

• **Cirkulující endotelové buňky (CEC) a cirkulující endoteliální prekurzory (EPC):** Nádorová angiogeneze/neovaskularizace umožňuje růst nádoru. Angiogenezi přímo v nádoru je možné stanovit na základě hodnocení denzity kapilár ve tkáni a na systémové úrovni je možné detekovat řadu aktivátorů, např. VEGF, bFGF, IL-8, EGF nebo inhibitorů (angiostatin, endostatin, trombospondin) angiogeneze, které se do periferní krve uvolňují z nádoru. Řada těchto molekul je produkována krevními destičkami, popř. leukocyty, proto sérum není vhodným materiálem pro stanovení těchto molekul. Nejvhodnějším materiálem se zdá být plazma s aditivou inhibujícími aktivaci destiček (CTAD-zkumavka). Aktivaci angiogeneze lze hodnotit na základě přítomnosti endoteliálních buněk v cirkulaci. *Hodnocení:* Průtokovou cytometrií na základě exprese specifických povrchových markerů (CD146, CD31, VEGF-R2, CD105) je možné detekovat různé buněčné subtypy včetně aktivovaných endoteliálních buněk, zralých endoteliálních buněk a endoteliálních progenitorů odvozených z kostní dřeně.

Doporučené použití pro klinické účely: I když jde zatím spíše o metody vhodné pro specializovaná pracoviště, má hodnocení parametrů angiogeneze narůstající význam především díky novým protinádorovým terapeutikům – inhibitorům angiogeneze, např. bevacizumab, sunitinib.

Literatura

1. **Fateh-Moghadam, A., Stieber, P.** Tumormarker und ihr sinnvoller Einsatz. J. Hartman Verlag GmbH, 1991.
2. **Bonfrer, J. M. G.** Working group on tumor marker criteria (WGTM). *Tumor Biol.*, 1990, 11, p. 287–288.
3. **Clamp, A., Danson, S., Nguyen, H., Cole, D., Clemons, M.** Assessment of the therapeutic response in patients with metastatic bone disease. *Lancet Oncol.*, 2004, 5, p. 607–616.
4. **Diamandis, E. P. et al.** Tumor markers: physiology, pathobiology, technology and clinical application, Washington : AACC Press, 2002, 542.

5. **Fleisher, M., Dnistrian, A. M., Sturgeon, C. M., Lamerz, R., Wittliff, J. L.** Practice Guidelines and Recommendations for Use of Tumor Markers in the Clinic. The National Academy of Clinical Biochemistry, 2003.
6. NCI Tumor Markers: Questions and Answers.
7. www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Detection/tumor-markers
8. **Lamerz, R., Albrecht, W., Bialk, P., Dati, F., Duffy, M. R., Gerl, E. et al.** Tumour markers in germ cell cancers: EGTM recommendations. *Anticancer Res.*, 1999, 19, p. 2795–2798.
9. **International Germ Cell Cancer Collaborative Group (IGCCCG)** International germ cell consensus classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. *J. Clin. Oncol.*, 1997, 15, p. 594–603.
10. **Soletormos, G., Semjonow, A., Sibley, P. E. C., Lamerz, R., Petersen, P. H., Albrecht, W., Bialk, P., Gion, M., Junker, F., Schmid, H.-P. et al.** Biological Variation of Total Prostate-Specific Antigen: A Survey of Published Estimates and Consequences for Clinical Practice. *Clin. Chem.*, 2005, 51, p. 1342–1351.
11. **Sturgeon, C.** Practice Guidelines for Tumor Marker Use in the Clinic. *Clin. Chem.*, 2002, 48, p. 1151–1159.
12. **Molina, R., Barak, V., van Dalen, A. et al.** Tumor markers in breast cancer. European Group on Tumor Markers Recommendations. *Tumor Biol.*, 2005, 26, p. 281–293.
13. **Duffy, M. J., van Dalen, A., Haglund, C. et al.** Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumor Markers (EGTM) guidelines. *Eur. J. Cancer*, 2003, 39, p. 718–727.
14. **Zima, T. et al.** *Laboratorní diagnostika*. 2. vydání, Galén, Karolinum: Praha 2007, s. 379–389.
15. **Wu, J. T.** *Circulating tumor markers of new millennium: target therapy, early detection and prognosis*. Washington: AACC Press, 2002, 173 p.

*Prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., MBA
předseda ČSKB ČLS JEP*

*Prof. MUDr. Jiří Vorlíček, CSc.
předseda ČOS ČLS JEP*

*Prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.
předseda imunoanalytické sekce ČSNM ČLS JEP*

9. září 2008