



# Nowotwory i ich diagnostyka.

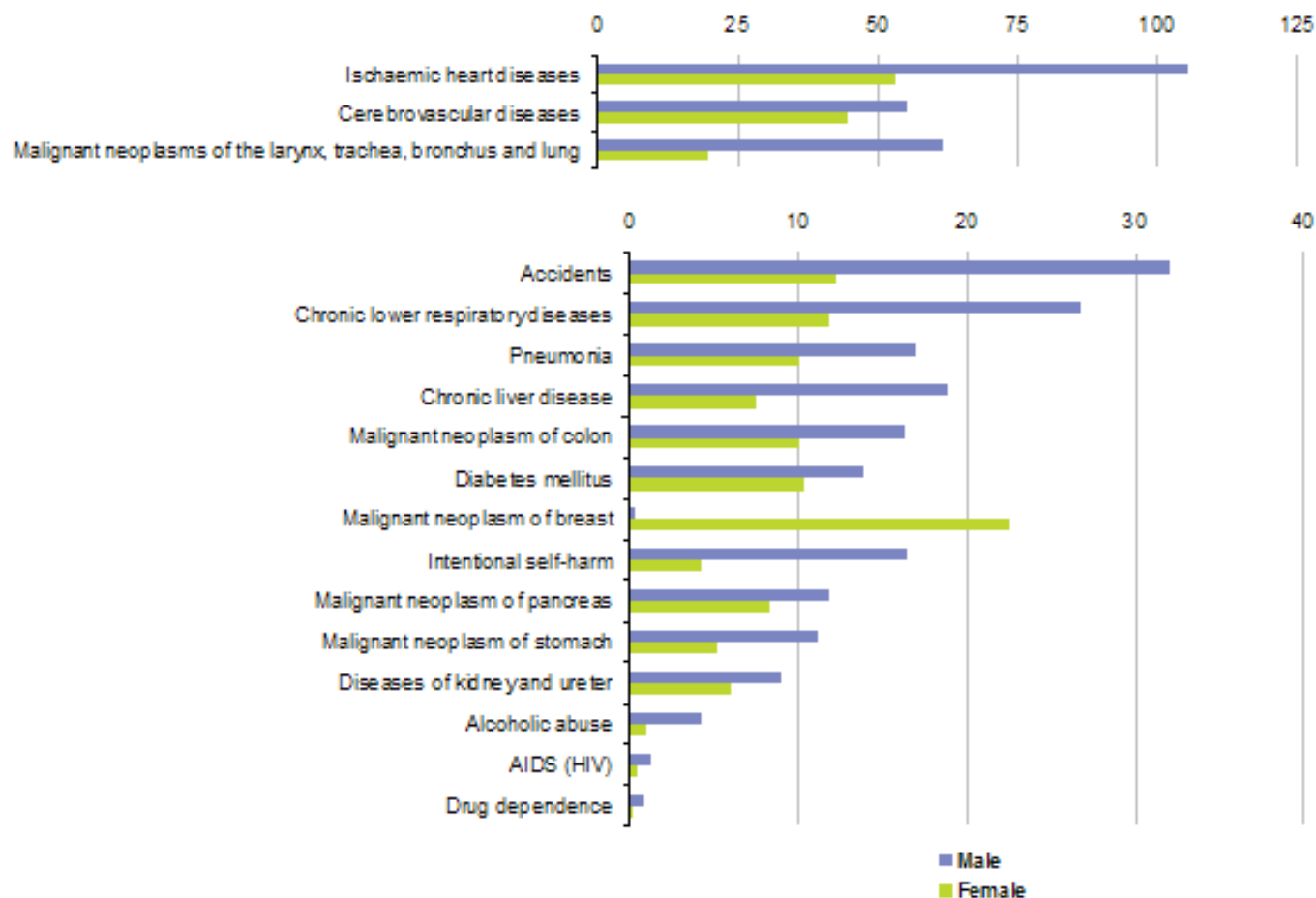
## Wykład 8

Dr Agnieszka Jaźwa  
agnieszka.jazwa@uj.edu.pl





# Główne przyczyny zgonów w EU



(1) Provisional; the figure is ranked on the average of male and female; note the difference in the scales employed between the two parts of the figure.  
Source: Eurostat (online data code: hlth\_od\_asdr)

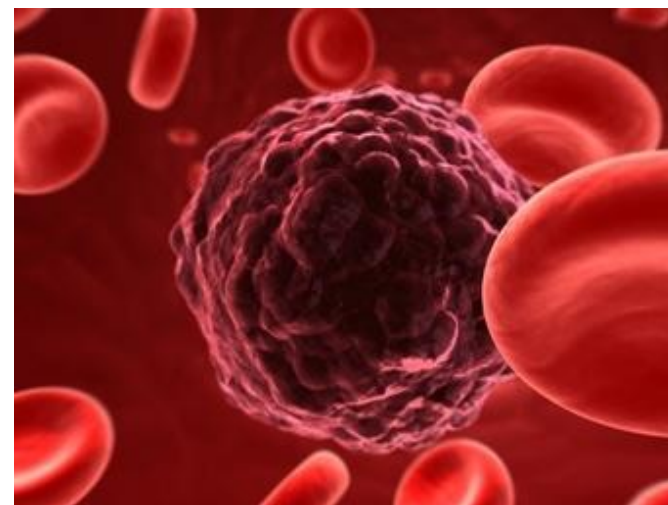
**Causes of death - standardised death rate, EU-27, 2010 (1) (per 100 000 inhabitants)**





# Nowotwór

- **Nowotwór** (łac. *neoplasma*, gr. *neoplasia*) – jest nieprawidłową tkanką, która rozrasta się w nadmiarze i w sposób nieskoordynowany z tkankami prawidłowymi.
- Nadmierna proliferacja utrzymuje się pomimo wyeliminowania czynnika, który ją wywołał, a nowo powstałe komórki nowotworowe nie różnicują się w tkankowo-specyficzne komórki.
- Utrata kontroli nad podziałami jest związana z mutacjami genów kodujących białka uczestniczące w cyklu komórkowym: **protoonkogenów** i **genów supresorowych**. Mutacje te powodują, że komórka wcale lub niewłaściwie reaguje na sygnały organizmu.
- Dziedziną medycyny zajmującą się rozpoznawaniem i leczeniem chorób nowotworowych jest **onkologia** (gr. onkos – guz).





# Nowotwór

## łagodny

- utworzony z tkanek zróżnicowanych i dojrzałych, o budowie mało odbiegającej od obrazu prawidłowych tkanek
- dobrze ograniczony, często otorbiony, rośnie wolno, rozprężając (uciskając sąsiadujące tkanki)
- nie daje przerzutów, a po należywym jego usunięciu nie powstaje wznowa (ponowny rozrost nowotworu w tym samym miejscu) - jest całkowicie wyleczalny
- przykłady: gruczolak, brodawczak, torbielak, włókniak, tłuszczak, mięśniak, naczyniak, potworniak dojrzały)

## złośliwy

- utworzony z komórek o niskim zróżnicowaniu (nieodjrzałych), o budowie znacznie odbiegającej od obrazu prawidłowych tkanek
- charakteryzuje się szybkim wzrostem, atypią i brakiem torebki
- rozprzestrzenia się poprzez naciekanie (wrastanie między komórki) pobliskich tkanek, co upośledza ich funkcję
- naciekając naczynia limfatyczne i krwionośne, przedostaje się do ich światła, a wraz z krwią lub chłonką dociera w odległe miejsce organizmu, gdzie daje początek nowemu guzowi - przerzut.
- przykłady: mięsak, potworniak niedojrzały, rak (nowotwór wywodzący się z tkanki nabłonkowej), chłoniak, białaczka, glejak.

## miejscowo-złośliwy

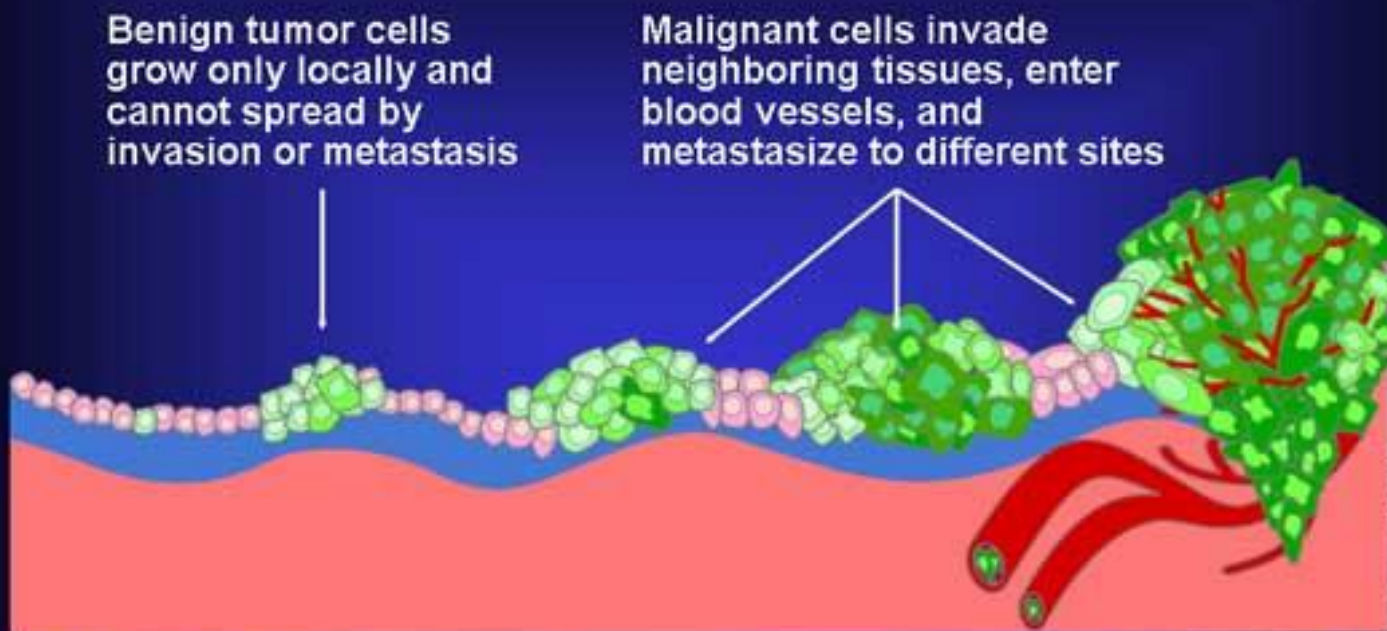
- zasadniczo nie dają przerzutów, ale dają nawroty po zabiegach operacyjnych
- przykłady: rak podstawnokomórkowy skóry, większość glejaków złośliwych mózgu, guz mieszany ślinianek, włókniaki powięziowe, potworniaki dojrzałe, szkliwiak żuchwy





# Etapy rozwoju nowotworu

## Cancer Tends to Involve Multiple Mutations



Mutation inactivates suppressor gene

Cells proliferate

Mutations inactivate DNA repair genes

Proto-oncogenes mutate to oncogenes

More mutations, more genetic instability, metastatic disease

NATIONAL  
CANCER  
INSTITUTE





# Czynniki rakotwórcze (karcynogeny)

czynniki, które wywołując mutacje w materiale genetycznym, przyczyniają się do rozwoju choroby nowotworowej

## fizyczne

**Promieniowanie jonizujące**  
**Promieniowanie UV**

## chemiczne

**arsen** (→ rak wątroby i oskrzeli),  
**azbest** (→ rak oskrzeli i śródbłoniak),  
**aminy aromatyczne** (→ rak pęcherza),  
**benzen** (→ białaczki),  
**nikiel** (→ rak oskrzeli i zatok przynosowych),  
**chlorek winylu** (→ rak wątrobowokomórkowy),  
**alkohol** (→ rak jamy ustnej, przełyku i krtani),  
**aflatoksyna** – wytwarzana przez pleśń z rodzaju *Aspergillus*

## biologiczne

**HHV-8** – herpeswirus 8 – mięsak Kaposiego  
**HPV** – Ludzki wirus brodawczaka – rak szyjki macicy, rak sromu, rak prącia  
**HBV, HCV** – Wirus zapalenia wątroby typu B i C – rak wątrobowokomórkowy  
**EBV** – Wirus Epsteina-Barr – ziarnica złośliwa (prawdopodobnie), rak jamy nosowo-gardłowej, chłoniak Burkitta, niektóre rzadkie postacie chłoniaków





# Diagnostyka nowotworów

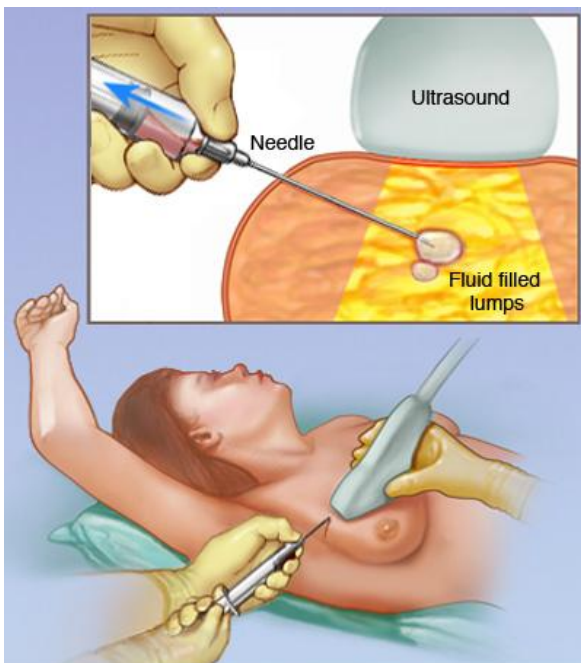
- 1) Diagnostyka histopatologiczna** wycinka pobranego z guza – **metoda podstawowa** – pozwala określić czy badana zmiana jest nowotworem, czy jest to nowotwór łagodny, czy złośliwy, naciekający, czy nienaciekający, typ i stopień złośliwości nowotworu – rutynowe barwienie hematoksyliną i eozyną (H&E)
- 2) Badanie cytologiczne** – rozpoznawanie nowotworów na podstawie pojedynczych komórek (cytodiagnostyka złuszczeniowa lub aspiracyjna – biopsja aspiracyjna cienkoigłowa)
- 3) Immunohisto-** oraz **immunocytochemia** – badanie materiału histologicznego i cytologicznego poprzez wykrywanie antygenów komórkowych
- 4) Metody morfometryczne** – cytometria przepływowa – ustalenie typu białaczki lub chłoniaka, ocena klonalności rozrostów w węzłach chłonnych
- 5) Metody cytogenetyczne i molekularne** – badanie zmian w garniturze chromosomalnym – wykrywanie dziedzicznych predyspozycji do rozwoju nowotworów złośliwych, wykrywanie nielicznych komórek nowotworowych po leczeniu, ocena rokowania
- 6) Biomarkery nowotworowe** – wykrywane metodami biochemicznymi w surowicy krwi i innych płynach ustrojowych





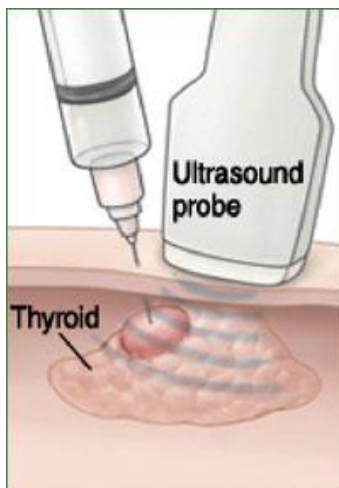
# Cytodiagnostyka

## Badania cytologii aspiracyjnej (*ang.* fine-needle aspiration cytology)

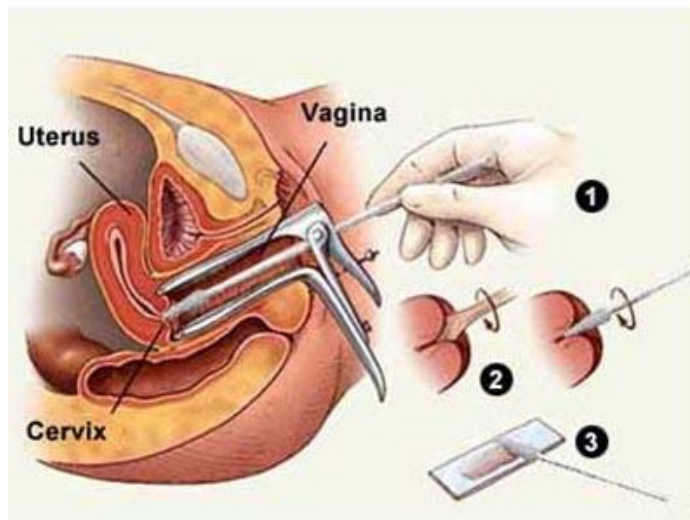


© MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. ALL RIGHTS RESERVED.

- Rak sutka
- Rak tarczycy
- Rak płuc
- Przerzuty nowotworowe do węzłów chłonnych i wątroby



## Badania cytologii złuszczeniowej



- Rak szyjki macicy
- Rak płuc
- Rak pęcherza moczowego
- Diagnostyka płynów z nowotworowo nacieczonych surowiczych jam ciała (jama opłucnej, osierdzia i otrzewnej)







# Rozpoznanie choroby nowotworowej – ogólne zasady





# Klasyfikacja histopatologiczna i kliniczna nowotworów

## Badanie histopatologiczne

- typ nowotworu (tkanka macierzysta)
- stopień zróżnicowania (*grade*)

0	G0	łagodny
I	G1	dobrze zróżnicowany
II	G2	miernie zróżnicowany
III	G3	słabo zróżnicowany
IV	G4	anaplastyczny

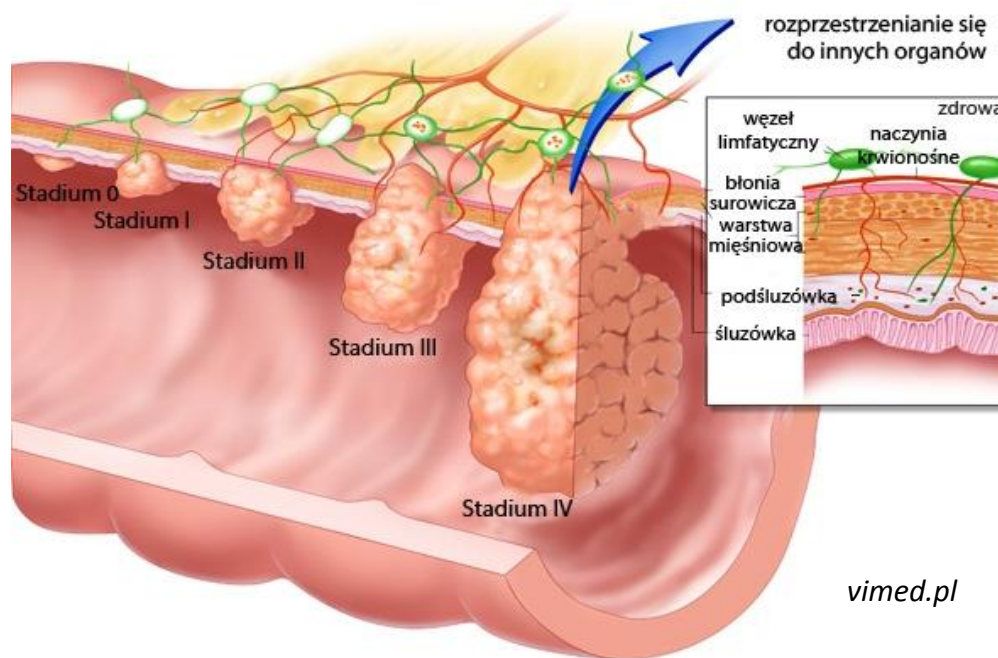
## Badanie kliniczne

- stopień zaawansowania (*stage*)
  - I najwcześniejsza faza rozwoju (75-100% leczonych chorych przeżywa 5 lat)
  - II początkowa faza rozwoju (50-75% leczonych chorych przeżywa 5 lat)
  - III nowotwór zaawansowany (25-50% leczonych chorych przeżywa 5 lat)
  - IV nowotwory bardzo zaawansowane, o złym rokowaniu (do 25% leczonych chorych przeżywa 5 lat)



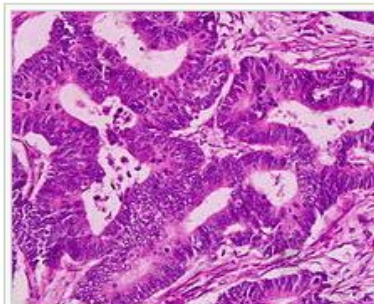


# Stopnie zaawansowania i różnicowania raka jelita grubego

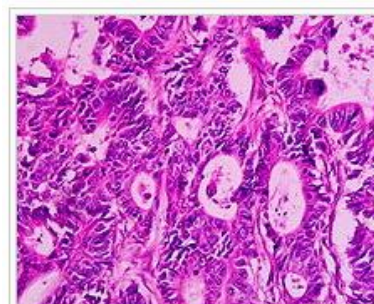


vimed.pl

## Barwienie H&E



Gruzołakorak odbytnicy, I (wysoki) stopień dojrzałości

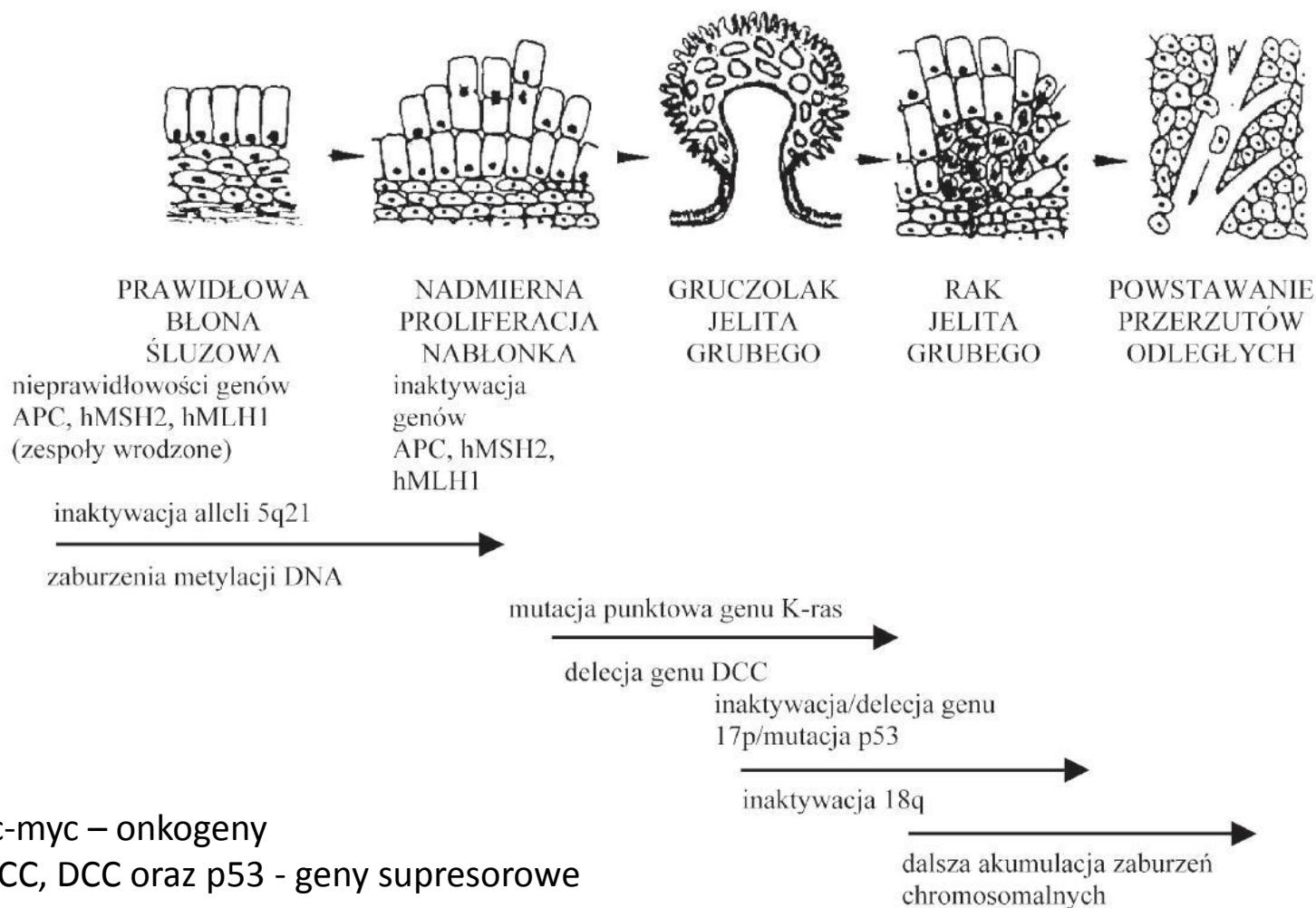


Gruzołakorak odbytnicy, II (średni) stopień dojrzałości





# Zaburzenia genetyczne w raku jelita grubego





# Markery nowotworowe

➤ substancje wydzielane przez nowotwór lub przez tkanki otaczające w odpowiedzi na nowotwór, a ich zwiększone stężenie w płynach ustrojowych może świadczyć o istnieniu choroby nowotworowej

- antygeny swoiste dla nowotworu / neoantygeny
- antygeny towarzyszące nowotworom
  - płodowo-zarodkowe (np. AFP) i łożyskowe (np. hCG)
  - antygeny węglowodanowe (np. CA 125, CA 15-3)
  - antygeny grupowe krwi (np. CA 19-9)
  - fragmenty cytokeratyny (np. CYFRA 21-1)
- (izo)enzymy (np. PSA)
- hormony produkowane eutopowo i ektopowo
- nieswoiste markery (cytokiny i receptory, białka ostrej fazy)
- geny / mutacje genetyczne (np. BCR/ABL, HER-2/neu)





# Zastosowanie markerów nowotworowych

- We wczesnych stadiach choroby poziom większości markerów nowotworowych jest podwyższony tylko w małym procencie przypadków.
- Natomiast w zaawansowanych, oczywistych klinicznie, stadiach choroby nowotworowej, użycie markera nie ma większego znaczenia.



**Markery nowotworowe mają tylko wartość dodatkowej informacji i nie mogą być podstawą ustalenia rozpoznania choroby nowotworowej.**

- 1) badania przesiewowe w kierunku nowotworów
- 2) wykrywanie / rozpoznanie nowotworu u pacjenta z podejrzeniem choroby nowotworowej
- 3) ocena stopnia zaawansowania nowotworu i rokowania
- 4) przewidywanie odpowiedzi na leczenie
- 5) kontrola skuteczności leczenia przeciwnowotworowego
- 6) badania kontrolne po leczeniu w celu wykrycia wznowy choroby
- 7) lokalizacja nowotworu (medycyna nuklearna) i celowana radioterapia





# Badania przesiewowe w kierunku chorób nowotworowych

- znane markery nowotworowe są zbyt mało czułe i swoiste, aby mogły służyć do wykrywania nowotworów w ramach populacyjnych badań przesiewowych - dodatnia wartość predykcyjna badania przesiewowego do wykrywania nowotworu powinna wynosić przynajmniej 20-30%, przy uwzględnieniu częstości występowania danego nowotworu w populacji (zachorowalność rzędu kilkadziesiąt-kilkaset/100 000)
- markery nowotworowe są wykorzystywane razem z innymi metodami diagnostycznymi w wybranych populacjach o zwiększonym ryzyku zachorowania na określone nowotwory
  - PSA + badanie *per rectum* – rak stercza w populacji mężczyzn między 45 (50) a 70 r.ż.
  - CA 125 + USG – rak jajnika w populacji kobiet o zwiększonym ryzyku zachorowania (przypadki raka jajnika wśród bliskich krewnych)
  - $\beta$ hCG – nowotwory kosmówkowe u kobiet po usunięciu zaślaniad groniastego
  - CEA + obecność krwi w kale – rak jelita grubego u osób ze zwiększonym ryzykiem zachorowania
  - AFP – rak z komórek wątrobowych w określonych populacjach o dużej częstości występowania tego nowotworu (Chiny, Tajwan, Japonia, Alaska)





# Wykrywanie / rozpoznawanie chorób nowotworowych

- do pewnego rozpoznania nowotworu konieczne jest badanie histopatologiczne
  
- wybrane markery mogą pomóc w ustaleniu rozpoznania u osoby z objawami sugerującymi chorobę nowotworową:
  - CA 125 → rak jajnika
  - PSA, PAP → rak gruczołu krokowego
  - CEA → rak jelita grubego
  - AFP → pierwotny rak wątroby
  - kalcytonina → rak rdzeniasty tarczycy
  - $\beta$ hCG i AFP → nowotwory zarodkowe
  
- dodatni wynik markera nie potwierdza rozpoznania nowotworu, ujemny wynik nie wyklucza nowotworu  – znane markery są zbyt mało czułe i swoiste







# Ocena stopnia zaawansowania choroby i rokowania

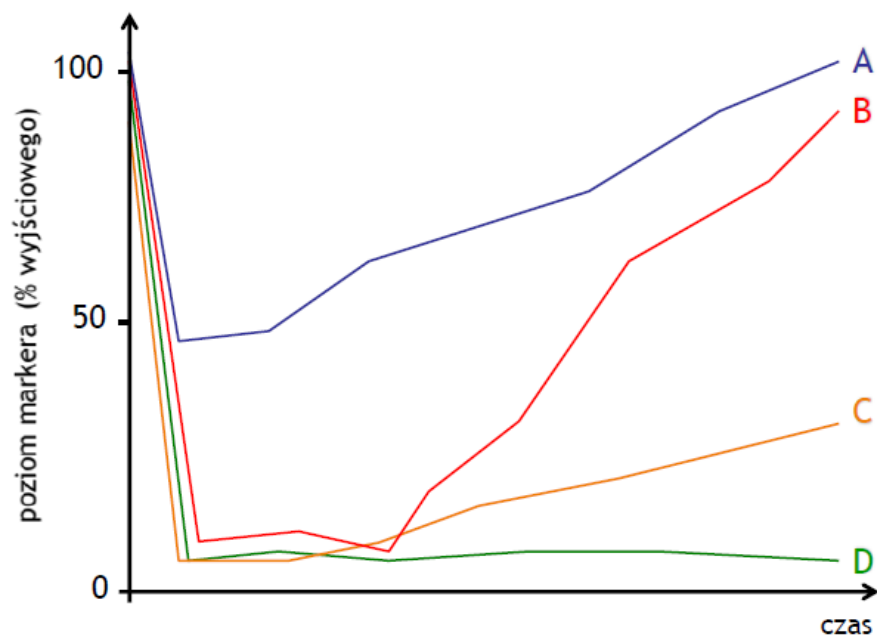
- opisano istotne statystycznie korelacje między poziomem niektórych markerów a stopniem zaawansowania choroby nowotworowej w grupach chorych z pewnymi rodzajami nowotworów (np. PSA w raku stercza)
- pojedynczy wynik u pojedynczego chorego ma ograniczone znaczenie: bezwzględne stężenia markerów w różnych stopniach zaawansowania choroby nakładają się (PSA rzędu 20-30 ng/ml może wystąpić w I-IV stopniu zaawansowania raka stercza)





# Kontrola skuteczności leczenia i kontrola po zakończeniu leczenia (wykrywanie wznowy / rozsiewu choroby)

- najczęstsze zastosowania markerów nowotworowych
- poziom większości markerów zmienia się proporcjonalnie do masy nowotworu: spada po skutecznej interwencji terapeutycznej, wzrasta wraz z rozsiewem nowotworu
- w wielu przypadkach mamy do czynienia z początkowym „paradoksalnym” wzrostem: np. po podaniu chemioterapii poziom markera początkowo rośnie, a potem dopiero spada (marker uwalniany z komórek nowotworu ulegających martwicy)
- w ocenie należy uwzględnić okres półtrwania markera np. we krwi



- A – częściowa remisja, następnie rozsiew choroby
- B – całkowita remisja, następnie przerzuty
- C – całkowita remisja, następnie wznowa miejscowa
- D – całkowita remisja, bez wznowy



# Enzymy jako markery nowotworowe

## ALP – fosfataza alkaliczna (*ang.* alkaline phosphatase)

- izoenzymy: wątrobowy, kostny (BALP) i łożyskowy (PLAP, izoenzym Regana)
- wysoka aktywność w przerzutach do wątroby lub kości
- pierwotny rak wątroby
- PLAP: rak jajnika, płuc, p. pokarmowego, nowotwory trofoblastu, **nasieniaki, choroba Hodgkina**

## LDH – dehydrogenaza mleczanowa (*ang.* lactate dehydrogenase)

- uwalniana w wyniku rozpadu komórek
- nowotwory hematologiczne (chłoniaki, ostre białaczki), guzy lite (wątroby, sutka, p. pokarmowego, płuc, jądra)
- aktywność koreluje z masą guza

## uPA, PAI-1 – enzymy układu fibrynolizy (*ang.* urokinase plasminogen activator; plasminogen activator inhibitor-1)

- podwyższony poziom u-PA i PAI-1 wiąże się ze złym rokowaniem u pacjentek z rakiem sutka
- podwyższony poziom uPA lub PAI-1 u pacjentek z rakiem sutka może być wskazaniem do podania chemioterapii po leczeniu chirurgicznym
- mają związek z angiogenezą i zahamowaniem apoptozy





# Enzymy jako markery nowotworowe – cd.

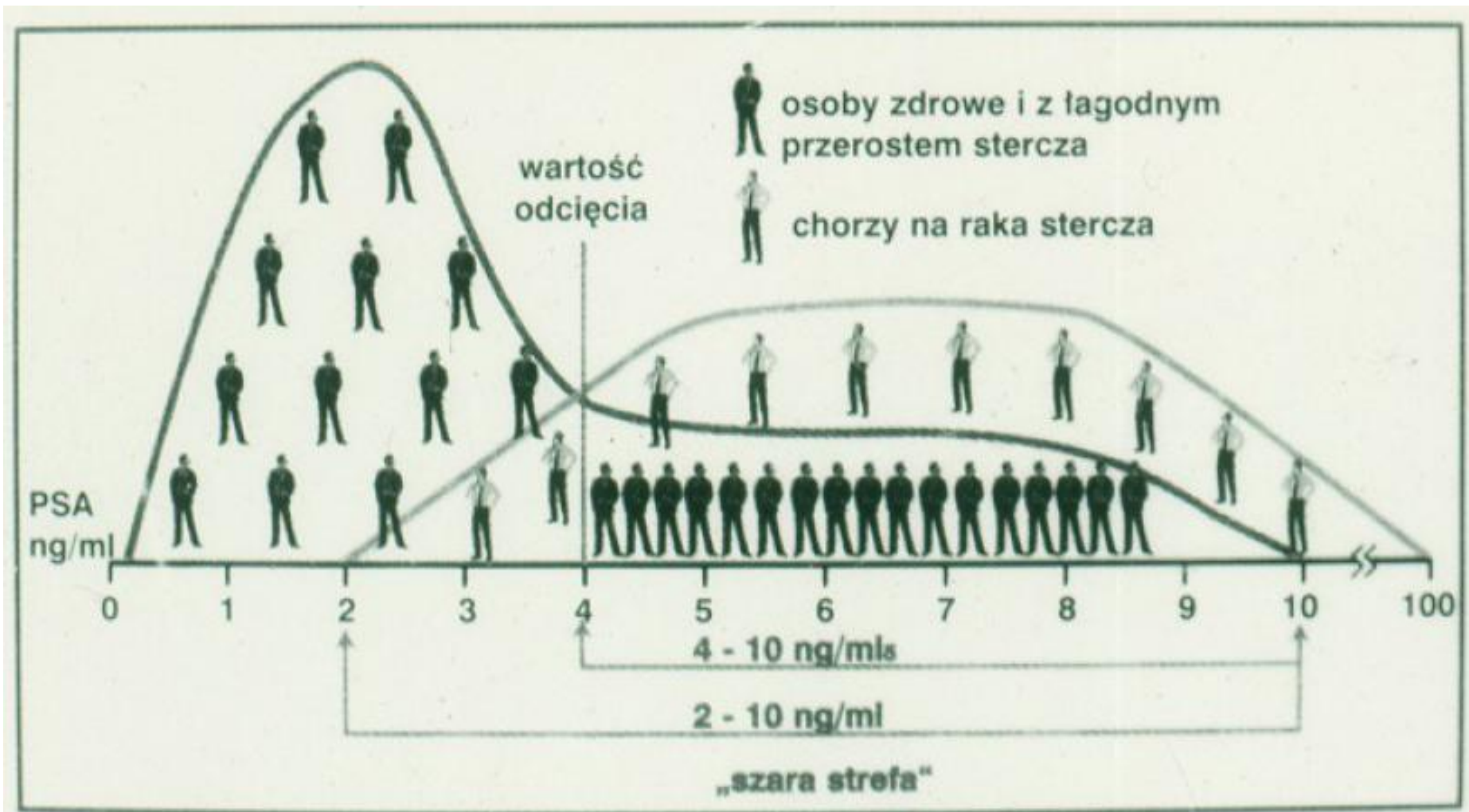
## PSA – swoisty antygen sterczowy (*ang.* prostate specific antigen)

- glikoproteina (pojedynczy łańcuch białkowy), proteaza serynowa z rodziny kalikrein
- we krwi występuje przede wszystkim w formie kompleksu z  $\alpha$ 1-antychymotrypsyną (PSA-ACT; 55-95%) i  $\alpha$ 2-makroglobuliną (PSA-A2M), mniejszą część stanowi wolny PSA (fPSA)
- większość zestawów immunochemicznych mierzy PSA-ACT i fPSA – total PSA (tPSA)
- długi okres półtrwania we krwi (fPSA ok. 22 godz., tPSA ok. 33 godz.)
- PSA rośnie po zabiegach na gruczole krokowym, po przezodbytnicznym badaniu prostaty, przemijający wzrost także po ejakulacji
- marker swoisty narządowo - produkowany głównie przez komórki pęcherzyków i przewodów gruczołu krokowego
- wartości graniczne: 4,0-10,0 ng/ml - rak lub łagodny przerost prostaty
- fPSA/tPSA <10 wskazuje na raka stercza, >25 na łagodny przerost prostaty
- metody (immunochemiczne) tradycyjne (czułość 0,1 ng/ml) i ultraczułe (0,01-0,001 ng/ml)
- różne wartości dla różnych grup wiekowych: <1,5 ng/ml - 40-49 lat; <2,5 ng/ml - 50-59 lat; <4,5 ng/ml - 60-69 lat; <7,5 ng/ml - 70-79 lat (wg. Jacques Wallach, Medipage, 2011)

## PAP – sterczowa fosfataza kwaśna (*ang.* prostatic acid phosphatase)

- mniej czuła niż PSA we wczesnych stopniach zaawansowania raka stercza
- rzadziej niż PSA wzrasta w łagodnym przerostie prostaty







# Hormony jako markery nowotworowe

<b>ACTH</b>	zespół Cushinga, rak płuc
<b>PTH</b>	różne (rak wątroby, nerki, sutka, płuc...)
<b>PRL</b>	gruczolak przysadki, rak płuc, rak nerki
<b>ADH</b>	DRP, gruczolak/rak kory nadnerczy, rak trzustki
<b>GH</b>	gruczolak przysadki, rak nerki, rak płuc
<b>kalcytonina</b>	rak rdzeniasty tarczycy
<b>hCG</b>	nowotwory zarodkowe, nowotwory trofoblastu, nowotwory jądra
<b>hPL</b>	nowotwory trofoblastu, gonad, rak płuc, rak sutka
<b>VIP</b>	rak trzustki, rak płuc, guz chromochłonny nadnerczy, <i>neuroblastoma</i>
<b>katecholaminy</b>	guz chromochłonny nadnerczy



# Hormony jako markery nowotworowe – cd.

## hCG – gonadotropina kosmówkowa

- hCG - ludzka gonadotropina kosmówkowa: dimer  $\alpha$ - $\beta$  (glikoproteina)
- podjednostka  $\alpha$  wspólna dla hCG, LH, FSH, TSH
- podjednostka  $\beta$  swoista dla hCG
- we wczesnej ciąży przewaga podjednostki  $\beta$ , w późnej  $\alpha$
- u pacjentów z nowotworami różnie, zwykle przewaga podjednostki  $\beta$  (wolna  $\beta$ hCG + hCG)
- prawidłowy poziom u nieciążarnych kobiet i mężczyzn  $<5$  IU/l
- poziom podwyższony u wszystkich pacjentek z nowotworami trofoblastu (nawet  $>1$  mln. IU/l), koreluje z masą guza i z rokowaniem
- poziom podwyższony u 70% chorych z nowotworami jądra innymi niż nasieniaki
- może być podwyższona w czerniaku, raku sutka, w marskości wątroby, chorobach zapalnych jelit i chorobie wrzodowej dwunastnicy
- można mierzyć w płynie mózgowo-rdzeniowym

## Kalcytonina

- Syntetyzowana przez komórki C tarczycy
- marker raka rdzeniastego tarczycy (wartości dopuszczalne  $<10$  ng/l)
- Test z pentagastryną
- Badanie przesiewowe u osób spokrewnionych
- Ektopowe wydzielanie w innych nowotworach





# Antygeny płodowo-zarodkowe

## AFP – $\alpha$ -fetoproteina (*ang.* alpha-fetoprotein)

- marker pierwotnego raka wątroby i nowotworów zarodkowych (nie nasieniaków)
- znaczne ilości wytwarzane przez wątrobę i pęcherzyk żółtkowy zarodka / płodu
- glikoproteina o ok. 30% homologii z albuminą
- prawidłowo <10 ng/ml, w ciąży rośnie od 12 tyg., w 3. trymestrze ok. 500 ng/ml
- nadmierny wzrost poziomu AFP we krwi ciężarnej → obecność wad rozwojowych cewy nerwowej i mózgu płodu; obniżenie poziomu → obecność zespołu Downa
- >500 ng/ml u nieciążarnych oznacza nowotwór
- >10-20 ng/ml - w marskości lub zapaleniu wątroby

## CEA – antygen karcynoembrionalny (*ang.* carcinoembryonic antigen)

- rodzina błonowych białek adhezyjnych o strukturze immunoglobulin
- gruczolakeraki, zwłaszcza jelita grubego i odbytnicy (ekspresja CEA w komórkach raka jelita grubego jest ok. 60-krotnie wyższa niż w prawidłowych komórkach śluzówki jelita)
- rak żołądka, trzustki, piersi, płuca, narządów rodnych, pęcherza moczowego, stercza
- palacze, kobiety w ciąży, osoby po spożyciu alkoholu, chorzy z ostrym i przewlekłym stanem zapalnym, cukrzycy mogą mieć nieznacznie podwyższony poziom
- oznaczanie: przed leczeniem raka jelita grubego – wartość prognostyczna po operacji – normalizacja do 6 tyg. potwierdza radykalność kontrola w czasie leczenia i po leczeniu (co 2-3 miesiące przez 3 lata)







# Białka szkieletu komórkowego - cytokeratyny

## markery proliferacji guza

### TPA - tkankowy antygen polipeptydowy

- podwyższony w raku przewodów żółciowych, nie w wątrobowokomórkowym

### TPS - swoisty tkankowy antygen polipeptydowy

- koreluje z aktywnością choroby i rokowaniem w raku płuc

### CYFRA 21-1 - fragment cytokeratyny 19

- podwyższona w raku płuc, zwłaszcza w niedrobnokomórkowym
- koreluje z zaawansowaniem choroby, użyteczna w kontroli leczenia

### SCCA (SCCAg) - antygen raka płaskonabłonkowego

- podwyższony w rakach płaskonabłonkowych (płuc, szyjki macicy, głowy i szyi, p. pokarmowego, jajnika, dróg moczowych)
- koreluje z zaawansowaniem choroby, użyteczny w kontroli leczenia
- wydzielany w ślinie, z powietrzem wydychanym i z potem → łatwo o kontamiancję próbek w laboratorium



# Antygeny węglowodanowe / transplantacyjne

## mucyny

CA 125	rak jajnika, rak macicy
CA 15-3, CA 549, CA 27.29	rak sutka, rak jajnika
MCA	rak sutka, rak jajnika
DU-PAN-2	rak trzustki, jajnika, p. pokarmowego, płuc

## antygeny grup krwi

CA 19-9	rak trzustki, p. pokarmowego, wątroby
CA 19-5	rak trzustki, p. pokarmowego, jajnika
CA 50	rak trzustki, p. pokarmowego
CA 72-4	rak sutka, rak jajnika, p. pokarmowego
CA 242	rak trzustki, p. pokarmowego





## CA 125

- glikoproteina wytwarzana przez komórki nabłonka otrzewnej, opłucnej, osierdza, endometrium, jajowodów, nabłonek szyjki macicy
- ekspresja w komórkach raka jajnika i innych wychodzących z komórek niezarodkowych jajnika
- wartości prawidłowe <35 U/l
- w raku jajnika podwyższony u 50% chorych z I stopniem zaawansowania i 90% chorych z bardziej zaawansowanym nowotworem, poziom koreluje z masą guza
- pomaga w rozróżnieniu łagodnych i złośliwych zmian w jajnikach (planowanie operacji)
- kontrola po leczeniu chirurgicznym (T<sub>1/2</sub> ok. 5 dni)
- rokowanie co do skuteczności chemioterapii
- wykrywanie progresji i wznowy



# Inne markery białkowe

## białka

<b>β2-mikroglobulina</b>	szpiczak mnogi, chłoniaki B-komórkowe, CLL, makroglobulinemia Waldenströma
<b>immunoglobuliny monoklonalne, białko Bence-Jonesa (monoklonalne wolne łańcuchy lekkie)</b>	szpiczak mnoho, chłoniaki
<b>S100 β</b>	czerniak
<b>S100 A2, A4, A6</b>	rak sutka, przetyku, żołądka (m.histologiczne)
<b>tyreoglobulina (Tg)</b>	dobrze zróżnicowany rak tarczycy
<b>peptyd C</b>	insulinoma
<b>chromograniny (CgA, CgB)</b>	guzy neuroendokrynne (chromochłonny, rakowiak, <i>neuroblastoma</i> )





# Receptory błonowe

## ER $\alpha$ i $\beta$ , PR A i B - rec. estrogenowe i progesteronowe

- obecne w tkankach prawidłowych (macica, przysadka, podwzgórze, gruczoł sutkowy)
- mają znaczenie w onkogenezie
- w raku sutka znaczenie rokownicze i w przewidywaniu odpowiedzi na leczenie hormonalne: pacjentki z rakiem ER+ powinny być leczone hormonalnie (tamoksyfen, raloksyfen – selektywne modulatory receptorów estrogenowych, SERM)

## EGFR

- zły wskaźnik prognostyczny w raku piersi, jelita grubego, przełyku, żołądka, głowy i szyi, jajnika, szyjki macicy i trzonu macicy, pęcherza moczowego





# Markery genetyczne

## onkogeny

<i>ras (N-ras, K-ras)</i>	różne (rak trzustki, j. grubego, płuc, pęcherza moczowego)
<i>c-myc</i>	chłoniaki i białaczki, mięsaki, rak j. grubego, szyjki macicy, żołądka, wątroby
<i>Her-2/neu</i>	rak sutka, jajnika i p. pokarmowego
<i>bcl-2</i>	chłoniaki i białaczki
<i>BCR-ABL</i>	CML, ALL

## geny supresorowe

<i>RB</i>	rodzinne występowanie <i>retinoblastoma</i>
<i>APC</i>	polipowatość rodzinna jelita grubego; rak jelita grubego i inne
<i>BRCA 1 i 2</i>	rodzinne występowanie raka sutka i jajnika





# Markery genetyczne – cd.

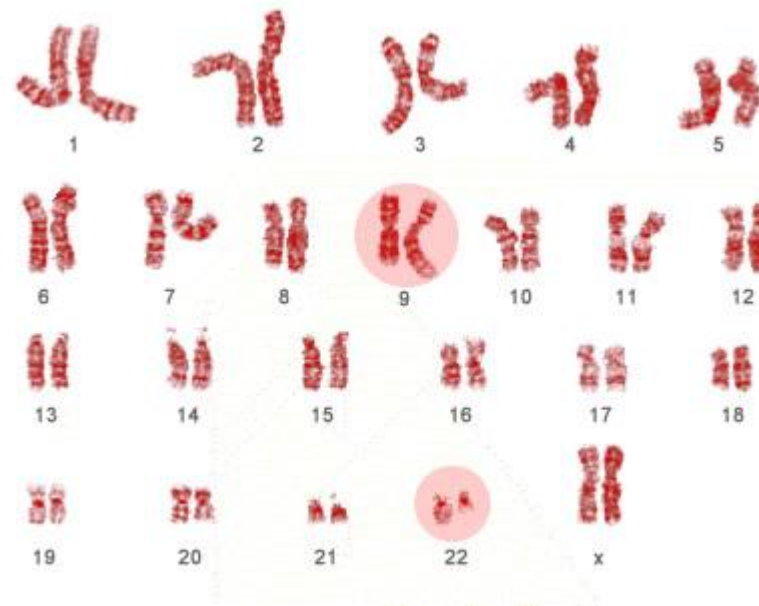
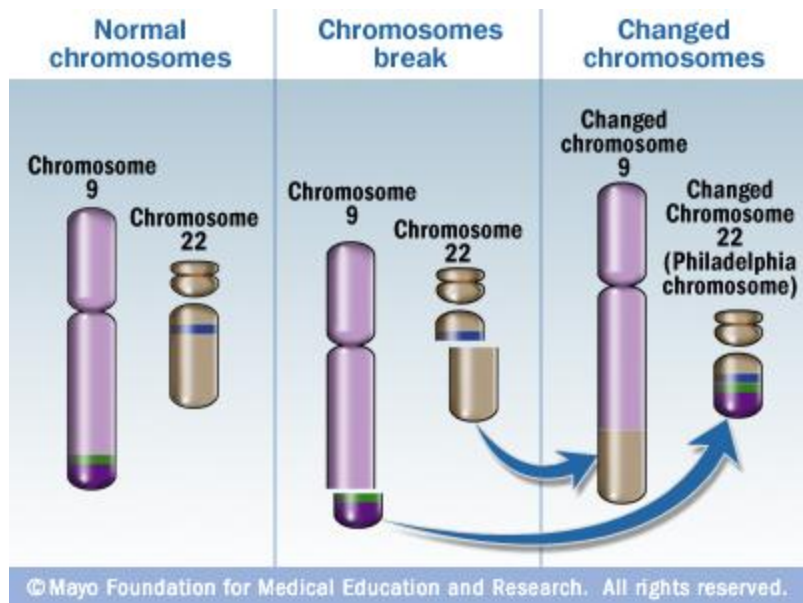
- obecność onkogenów oznacza się np. **metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH)** w komórkach nowotworu → ich wykrycie może mieć znaczenie dla podjęcia określonych decyzji terapeutycznych (np. leczenie herceptyną pacjentek z rakiem piersi Her-2/neu dodatnim) i w ocenie rokowania
- cytogenetyczna diagnostyka białaczek i chłoniaków
- obecność mutacji genów supresorowych może wskazywać na zwiększone ryzyko rozwoju określonego rodzaju nowotworów u pacjenta. Mutacje genów supresorowych wykrywa się metodami biologii molekularnej u osób z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku wybranych chorób nowotworowych. Np. wykrycie mutacji genu BRCA-1 lub BRCA-2 wskazuje na zwiększone zagrożenie rozwojem raka piersi i jajnika u pacjentki – należy ją zatem poddawać regularnym badaniom przesiewowym w kierunku tych nowotworów tak, aby wcześniej je wykryć (w niektórych krajach / przypadkach rozważa się nawet profilaktyczną mastektomię i ooforektomię – zabieg usunięcia jajników).





# Cytogenetyczna diagnostyka CML

## Chromosom Philadelphia



Powstały gen fuzyjny - kinaza tyrozynowa **bcr-abl** - wykazuje stałą aktywność, co prowadzi do wzmożonej proliferacji (namnażania) macierzystych komórek szpikowych.



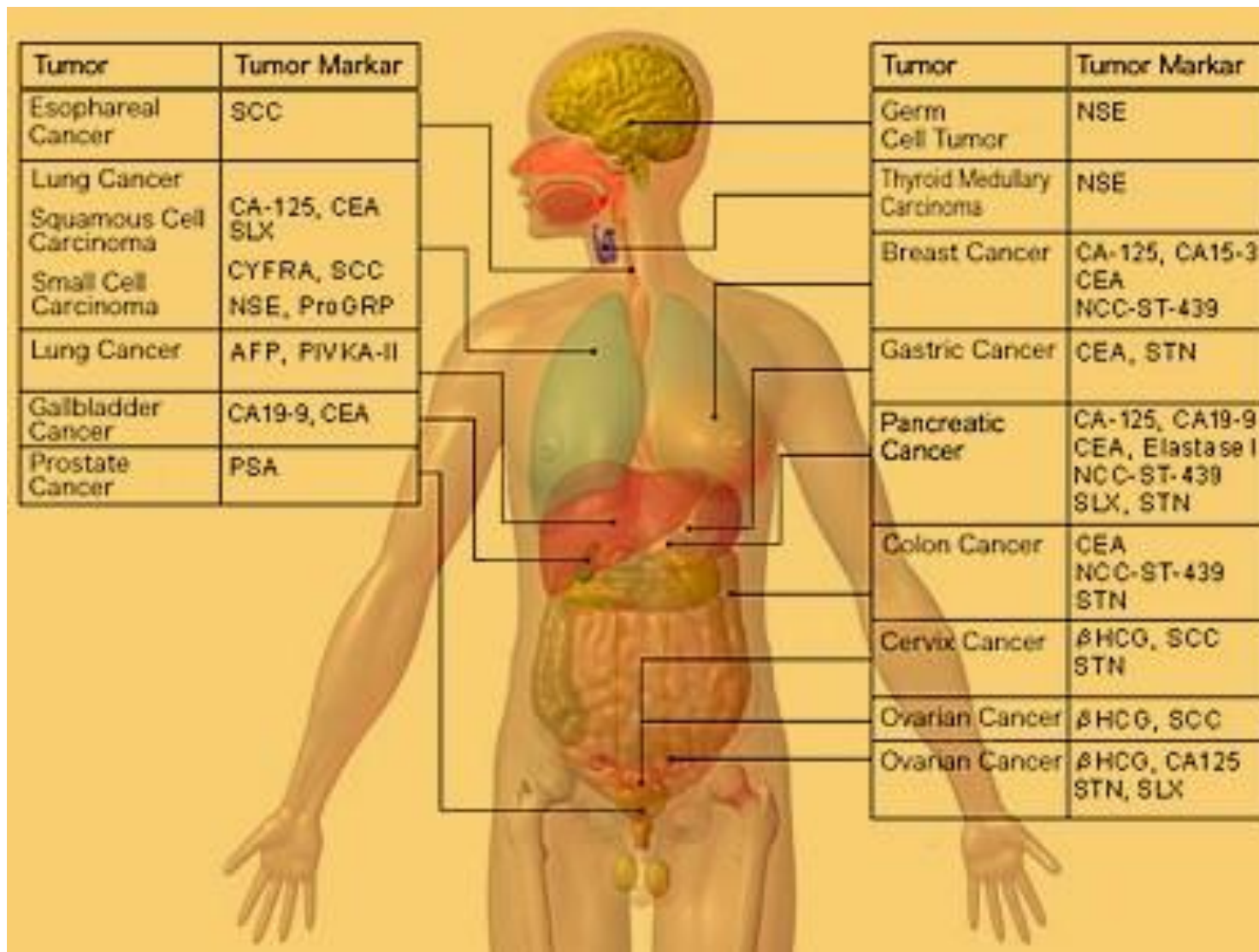
**przewlekła białaczka szpikowa (CML)**





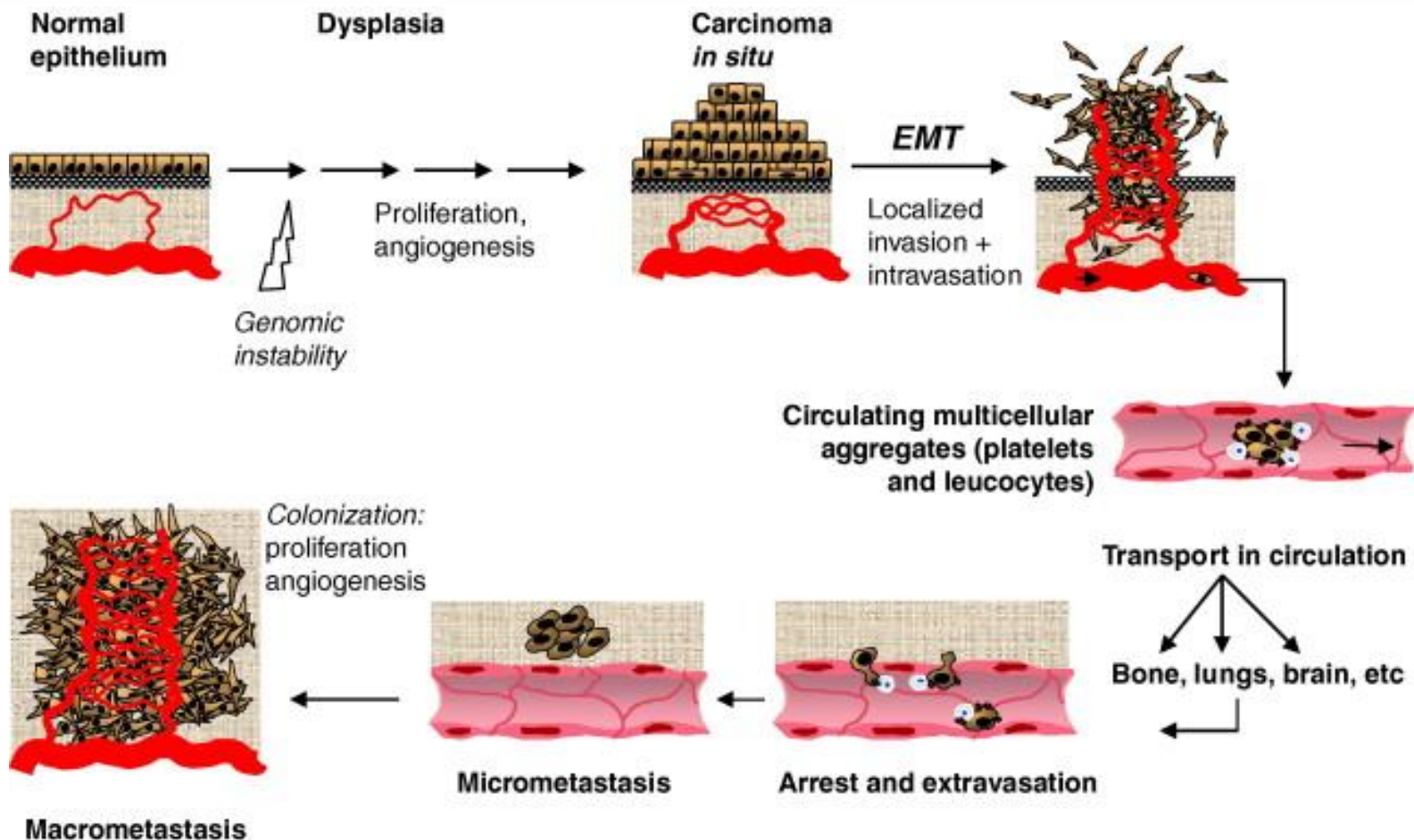


# Markery nowotworowe w diagnostyce





# „Tropienie” przerzutów nowotworowych



Pomimo, że testy z użyciem przeciwciał monoklonalnych stają się coraz bardziej czułe, nie są jednak w stanie uwidoczniać pojedynczej komórki we krwi, ale jest to możliwe przy użyciu techniki PCR.

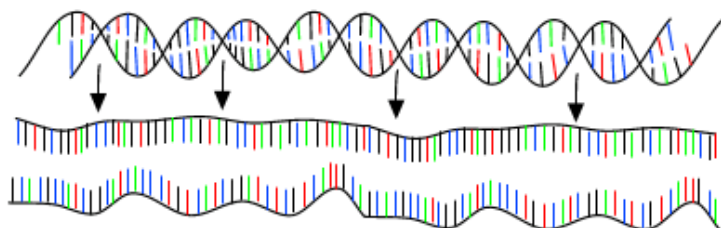




# Technika PCR (*ang.* polymerase chain reaction)

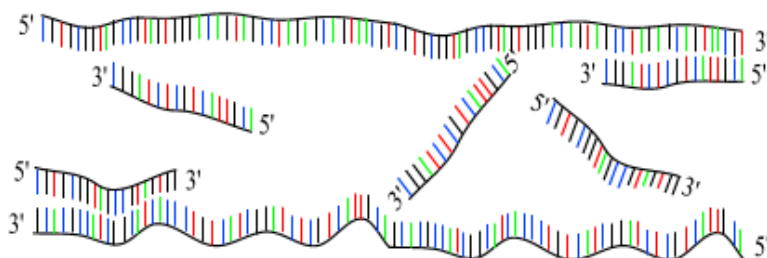
## Przebieg reakcji PCR

Reakcja PCR przebiega w 3 etapach cyklicznie, w zmieniających się temperaturach:



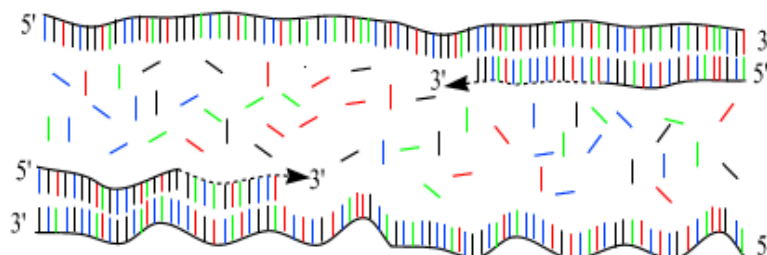
Etap I: denaturacja

Pod wpływem wyższej temperatury (95st.C) podwójna nić DNA rozpada się na pojedyncze nici



Etap II: przyłączenie tzw. "primerów"

Primery to syntetyczne, krótkie fragmenty DNA, które na zasadzie komplementarności przyłączają się do obu krańców odcinka DNA, który chcemy powielić.



Etap III: wydłużanie "primerów"

Do przyłączonych primerów specjalny enzym polimeraza Taq dobudowuje wolne nukleotydy, odtwarzając kopię pierwotnej nici DNA.

*W kolejnych cyklach reakcji PCR ilość powielonych fragmentów pierwotnej matrycy DNA ulega zwiększeniu w postępie geometrycznym, osiągając nawet do 1 miliona kopii (po 30-40 cyklach). Dzięki temu możliwa jest analiza mikrośladów biologicznych, a nawet pojedynczych komórek.*





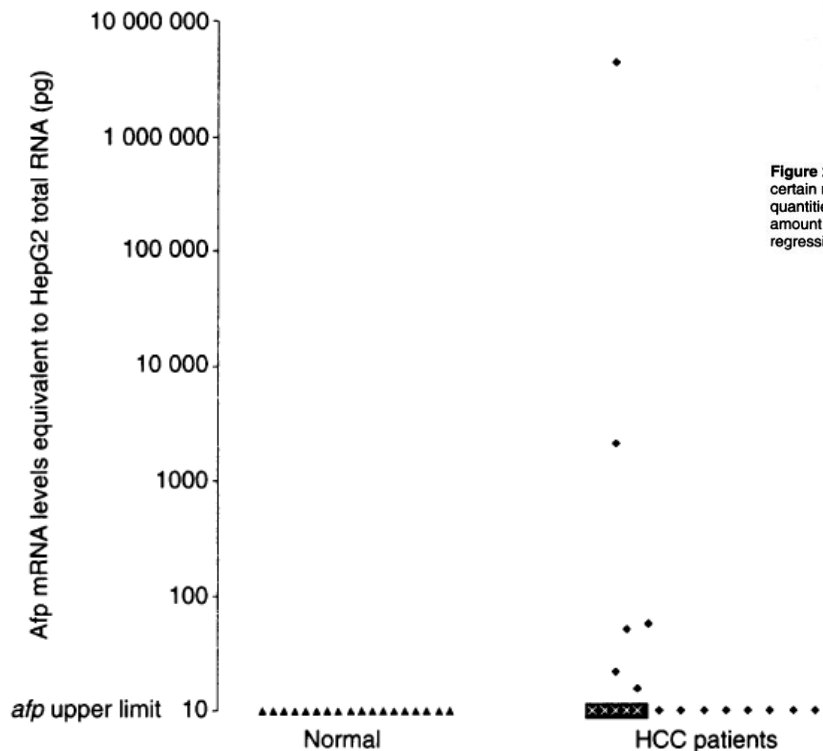
# Wykrywanie krążących we krwi komórek raka wątrobowo-komórkowego poprzez analizę ekspresji *AFP* techniką PCR

**AFP –  $\alpha$ -fetoproteina**

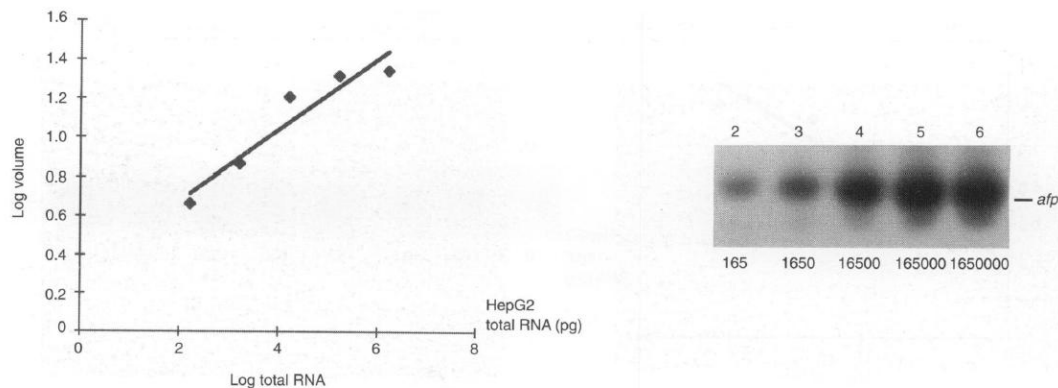
**HCC – rak wątrobowokomórkowy**

*(ang. hepatocellular carcinoma)*

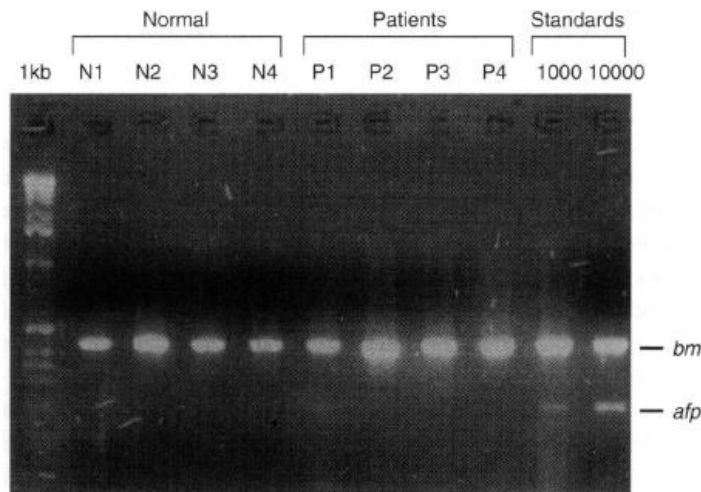
**HepG2 – komórki raka wątroby**



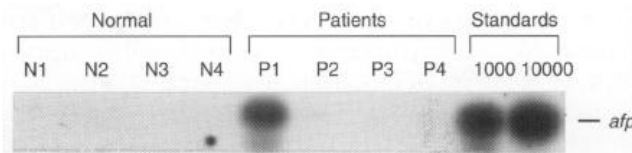
**Figure 4** *Afp* mRNA levels equivalent to HepG2 total RNA (pg) (on logarithmic scales) in peripheral blood (20 ml) from normal subjects ( $\blacktriangle$ ) and HCC patients ( $\blacklozenge$ ) ( $\blacktriangle$  represents one patient and  $\blacksquare$  represents ten patients). The levels were calculated according to the calibration curve of the volume of the *afp* PCR product against HepG2 total RNA on logarithmic scales. The upper limit of the *afp* mRNA reference range for the normal group is indicated



**Figure 2** Measurement of *afp* mRNA signals by semi quantitative RT-PCR. Total RNA extracted from  $10^6$  normal PMNCs was spiked with total RNA of a certain number of HepG2 cells ( $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  or  $10^6$ ), as shown in lanes 2, 3, 4, 5 and 6 respectively (right). The bottom of the autoradiograph shows the quantities of HepG2 total RNA used for the RT-PCR assay. The relationship between the volume of the *afp* PCR product measured by densitometry and the amount of HepG2 total RNA spiked (on logarithmic scales) was found to be linear in a  $10^4$ -fold range equivalent to  $10^2$ – $10^6$  cells. The equation of the linear regression is  $y = 0.1819x + 0.3121$  and the square of the correlation coefficient is equal to 0.9077.



**Southern blot:**





# Do przygotowania na najbliższe ćwiczenia

## Diagnostyka zaburzeń hormonalnych:

- 1) Ocena czynnościowa tarczycy i osi przysadkowo-tarczycowej – badania laboratoryjne
- 2) Składowe osi podwzgórze-przysadka-nadnercza
- 3) Test hamowania deksametazonem – zasada i cel oznaczenia

