

Influența radiațiilor *UV-A* asupra interpretării corelate a markerilor tumorali *BRM* și *TPS* la pacientele cu cancer de sân

The influence of *UV-A* radiation upon the correlated analysis of *BRM* and *TPS* markers in women's breast cancer

Mihaela Hrisanta Scarlat*, Aurora Tache, F. Radu, Laura Calustian, Andreea Tache

Institutul Oncologic „Al. Trestioreanu”, Laboratorul de analize medicale

Rezumat

Cancerul de sân este una dintre cele mai lente tumori, atât perioada preclinică (înainte de diagnostic), cât și faza clinică (după tratamentul inițial și metastazare) măsurându-se în ani și decade. De aceea, este de importanță crucială ameliorarea indicatorilor testelor care indică reluarea activității celulare. Lucrarea prezintă un studiu de interpretare corelată a markerilor BRM (CA 15-3) și TPS, luând în considerație anumiți factori perturbatori ai rezultatelor, precum radiația UV-A existentă atât în radiația solară, cât și în surse artificiale de lumină, stresul preoperator, sau medicația. Simularea influenței UV-A s-a făcut prin iradierea probelor recoltate cu un laser adecvat. Studiul a fost efectuat pe paciente cu leziuni maligne ale sânelor, diagnosticate în urma examenului histopatologic postoperator, în Institutul Oncologic „Al. Trestioreanu” București, în perioada martie 2004-decembrie 2006. Recoltarea pentru determinarea markerilor s-a făcut conform unei scheme prestabilite. Pentru aprecierea testelor s-au folosit următorii indicatori: specificitatea, sensibilitatea, valoarea predictivă pozitivă și valoarea predictivă negativă. Radiația UV-A modifică indicatorii de test. În cazul interpretării corelate, se constată o ameliorare a indicatorilor luați în studiu, fapt ce pledează pentru determinarea concomitentă a BRM și TPS.

Cuvinte cheie: cancer de sân, TPS, BRM, UV-A.

Abstract

Breast cancer is one of the most sluggish evolution among the malignant tumors and consequently, both the pre-clinical and clinical stages (after the initial treatment and metastasy) are measured in years and decades. Therefore, it is of crucial importance the improving of the test indicators for the cell activity. The paper is presenting a correlated interpretation of the BRM (CA 15-3) and TPS cancer markers by considering as well the influence of some perturbing factors which might alter the results, such as the UV-A radiation from the

*Adresa pentru corespondență: București, șos. Fundeni nr. 252, Sector 2, Tel. 0747775807

sunlight or from the artificial fluorescent lamps, the pre-surgical stress or the medication. The UV-A influence was simulated by an adequate laser radiation impinging on the samples. The study was performed upon 80 female patients aged between 20 and 75 under investigation at the Oncology Institute "Al. Trestioreanu" Bucharest during the time interval March 2004 – December 2006. The malignant breast lesions were confirmed by the post surgical histopathological test. The measurements of the tumor markers CA 15-3 and TPS were made four times according to a well defined scheme. The test interpretation was assessed by considering the following test indicators: specificity, sensitivity, positive predictive value, and negative predictive value. The UV-A radiation is modifying the test indicators. The test indicators improve when cross correlating the BRM and TPS values, thus their simultaneous determination should be preferred.

Key words: breast cancer, TPS, BRM, UV-A.

Introducere

Cancerul de sân este una dintre cele mai lente tumori și, ca atare, atât perioada pre-clinică (înainte de diagnostic), cât și faza clinică (după tratamentul inițial și metastazare) se măsoară în ani și chiar zeci de ani.

Ratele de creștere pentru diferite tumori cu aceeași origine și histologic pot varia foarte mult. Momentul metastazării are loc cu mult timp înaintea manifestării clinice, încă în perioada ocultă a tumorii primare, când aceasta a atins dimensiunea de 10^4 - 10^6 celule, sau a parcurs în medie 20 de dublări. O bolnavă care se prezintă la medic cu cancer mamar avansat locoregional și-a derulat mai mult de 4/5 din evoluția naturală a bolii. În acel moment, volumul tumoral, după desfășurarea a 30-35 de dublări, este considerabil, atât locoregional, cât și la distanță, fiind estimat la 10^{11} celule.

Ganglionii regionali reprezintă prima stație de filtrare a celulelor tumorale migrate pe cale limfatică. Invazia ganglionară este legată de sediul tumorii, astfel cele cu localizare în cadranele extern și centrale se asociază mai frecvent cu invazia ganglionilor axilari.

Scopul studiului

Ne-am propus să monitorizăm evoluția unui lot de paciente, diagnosticate cu neoplasm mamar, prin determinări simultane ale antigenului specific cancerului de sân (BRM, CA 15-3) și antigenului polipeptidic specific

tisular (TPS), pentru a stabili dacă analiza corelată a acestora determină o creștere a indicatorilor, ajutând astfel la depistarea precoce a apariției determinărilor secundare. Pentru o interpretare corectă, am căutat să stabilim dacă factorii de mediu pot influența rezultatul obținut și am urmărit influența radiației ultraviolete din spectrul A (UV-A) asupra serului recoltat de la paciențele luate în studiu.

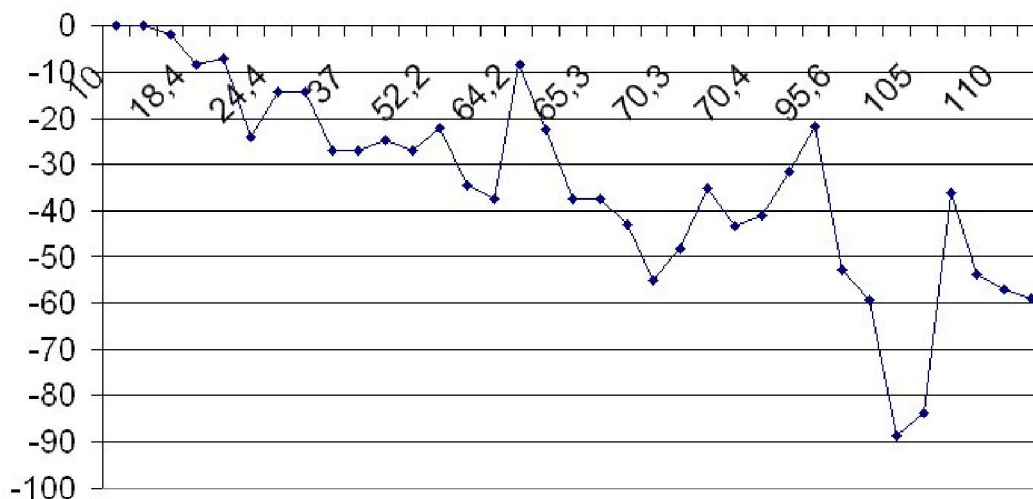
Pentru aprecierea testelor am folosit următorii indicatori: sensibilitatea (Sb), specificitatea (Sp), valoarea predictivă pozitivă (VPP) și valoarea predictivă negativă (VPN).

Pacienți

Au fost luate în studiu 80 de bolnave cu leziuni maligne ale sânelor, diagnosticate în urma examenului histopatologic postoperator, în Institutul Oncologic "Al. Trestioreanu", în perioada martie 2004-decembrie 2006, la care s-a făcut recoltarea de markeri tumorali CA 15-3 și TPS pre-operator, post-operator (în primele 48 de ore de la operație), înainte de externare (7-10 zile postoperator) și, periodic, la un interval de trei luni, când paciențele s-au prezentat la control.

Am ales un lot martor format din 22 paciente cu afecțiuni benigne ale sânelor (în urma examenului histopatologic).

Variația TPS



Nivelul initial al TPS

Figura 1. Variația nivelului TPS pentru probele cumulate

Metodologie și tehnică

Determinările au fost făcute cu analizorul Immulite.

Principiul testului este același pentru BRM și TPS: un dozaj imunometric chemiluminescent de tip secvențial, în două etape, cu un ciclu de incubare de 2×30 min.

Recoltarea: este necesar un volum de 5 μ l de ser, obținut după centrifugarea sângelui recoltat. Probele hemolizate pot prezenta valori modificate ale markerului. Serul se păstrează 5 zile la $2-8^{\circ}\text{C}$ sau două luni la -20°C . Reactivii se țin la $2-8^{\circ}\text{C}$. Intervalul de ajustare este de două săptămâni. Pentru BRM, domeniul de măsură este până la 300 u/ml, iar valorile intervalului de normalitate sunt 0-38 u/ml; pentru TPS, domeniul de măsură este până la 2400 u/ml, iar intervalul de normalitate recomandat este sub 80 u/ml.

Există o serie de factori legați de tehnica de lucru, care pot influența rezultatul și pot modifica concluziile:

- Centrifugarea sângelui înainte de formarea completă a cheagului poate antrena prezența de fibrină în ser. Pentru a evita rezultatele eronate datorate prezenței fibrinei, trebuie ca probele să fie lăsate un timp suficient înainte de preparare, mai ales în cazul bolnavilor cu tratament anticoagulant.

- Eșantioanele hiperlipemice necesită clarificare prin ultra-centrifugare.

- Eșantioanele hemolizate pot proveni dintr-o preparare inadecvată a serului înainte de a fi adus în laborator; de aceea se va cere repetarea recoltării, pentru a îndepărta factorul de eroare.

- Radiația UV-A remanentă poate modifica valorile markerilor.

Acest lucru a fost pus în evidență prin iradierea diferențiată a probelor cu pulsuri ale armonicii a treia a unui laser cu neodim, în domeniul UV-A, la lungimea de undă de 335 nm, la o densitate de energie comparabilă cu cea existentă în spectrul UV-A din radiația solară. Determinările s-au făcut atât înaintea, cât și

Nivelul final al TPS

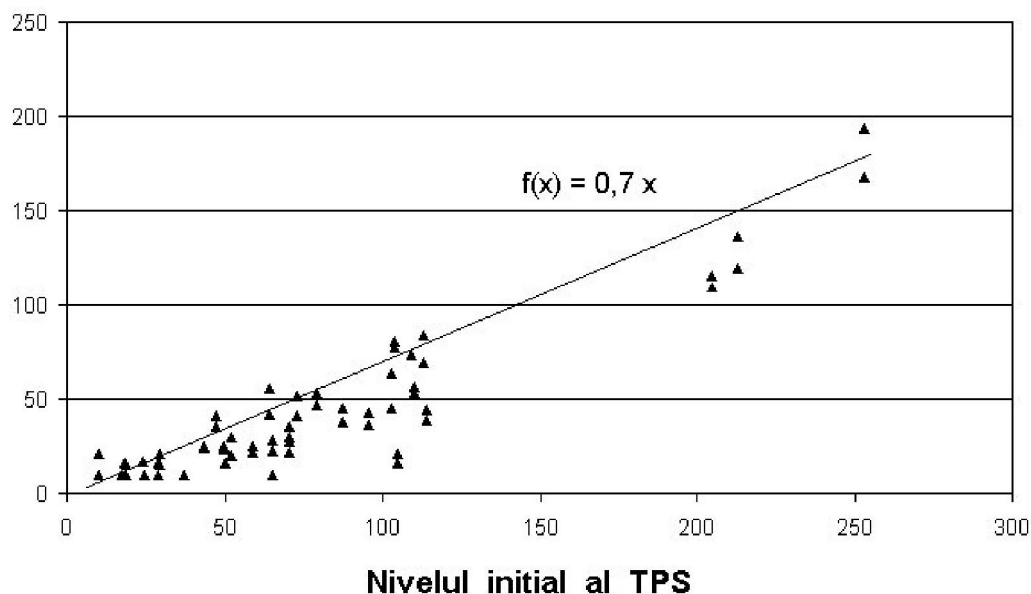


Figura 2. Nivelul final al TPS în funcție de nivelul inițial, la același nivel de iradiere (două pulsuri)

după iradierea diferențiată în domeniul UV-A. Iradierile au fost efectuate cu 1, 2, 5 și 10 pulsuri. Iradierea cu peste cinci pulsuri conduce la saturație, neexistând diferențe majore între iradierea cu cinci pulsuri sau cu zece pulsuri.

În 42 de cazuri, valoarea TPS a scăzut după iradiere (Figura 1). Valorile integrate reprezintă probele cumulate, indiferent de numărul pulsurilor de iradiere.

În afara zonei de saturație, nivelul final al TPS este aproape liniar dependent de nivelul său inițial, ceea ce indică o reacție puternică sub influența UV-A (Figura 2).

Ținând cont de faptul că CA 15-3 este o glicoproteină membranară, am vrut să vedem în ce măsură creșterea sa în ser este influențată de acțiunea radiațiilor UV. Spre deosebire de TPS, nivelul CA 15-3 este mult mai puțin sensibil la iradierea UV-A, el nefiind, practic, influențat în intervalul considerat⁵.

Rezultate și discuții

Determinarea preoperatorie la internare a evidențiat, la 64 pacienți, valori normale pentru CA 15-3, dar ușor crescute pentru TPS (80-250 ui/ml). Postoperator, valorile TPS au scăzut la 39 dintre acestea, încadrându-se, la o a doua determinare, în intervalul de normalitate. Celelalte 25 nu au prezentat variații față de determinările anterioare.

Toate aceste pacienți aveau diagnostic de afecțiune malignă și, în cadrul intervenției chirurgicale, s-a practicat evidarea ganglionară axilară. O serie de studii efectuate pe plan internațional arată o corelare a creșterii proporționale a CA 15-3 (peste 40 ui/ml) cu stadiul bolii, mărimea tumorii, existența metastazelor ganglionare, gradul de multiplicare a celulelor tumorale și lipsa receptorilor steroizi. Unele studii efectuate de Streckfus și colab. încearcă folosirea CA 15-3 în monitorizarea post-operatorie a pacienților cu recidive locale și metastaze, și constată că o

valoare a acestuia mai mare de 86u/ml indică prezența metastazelor (VPP=100%). În același studiu se arată că circa 45% din pacienții care dezvoltă metastaze prezintă o creștere a CA 15-3 cu aproximativ 2-9 luni înainte de apariția acestora. Limita utilizării CA 15-3 pentru monitorizarea recurențelor se datorează sensibilității scăzute în recidivele incipiente și absenței sensibilității la 30% din pacienți.

Determinarea preoperatorie a CA 15-3 este un factor independent de prognostic⁴ pentru perioada liberă de boală. O concluzie a aceluiași studiu este că valorile CA 15-3 cresc în 10% din cazurile cu recidive locale și în 40-80% din cazurile cu afecțiuni metastatice.

Am analizat toate aceste date de literatură încercând să stabilim importanța momentului determinării celor doi markeri (înaintea sau după intervenția chirurgicală), dacă tipul intervenției influențează valoarea inițială a CA 15-3 sau TPS, și am continuat să căutăm alți factori care pot influența valoarea reală a celor două antigene.

O mare parte a constituenților celulari reprezintă ținte ale atacului speciilor reactive de oxigen generate de iradierea UV-A¹⁻³. Astfel, radicalii hidroxil reacționează cu aproape toate tipurile de molecule din componența celulelor: glucide, fosfolipide, nucleotide, acizi organici și aminoacizi. Modificările oxidative ale proteinelor sub acțiunea speciilor reactive de oxigen pot determina inactivarea enzimelor și a proteinelor membranare (Dovrat și Weinreb, 1999), și pot produce modificări structurale soldate cu destabilizarea morfologiei celulelor atunci când țintele atacului oxidativ sunt elementele citoscheletului (Somosy, 2000).

Din totalul pacienților urmărite în studiu, 33 au prezentat valori pozitive ale markerilor la cel puțin una dintre determinări și, în urma analizelor suplimentare, s-a decelat apariția determinărilor secundare. Coroborând datele⁶, am obținut pentru BRM Sb=86 % (adevărat pozitiv AP=33, fals negativ FN=5), Sp=83% (adevărat negativ AN=35, fals pozitiv FP=7),

VPP=83% și VPN=61%.

La determinarea TPS, rezultatele au fost următoarele: Sb=73% (AP=28, FN=10), Sp=33% (AN=14, FP=28), VPP=50% și VPN=58%.

În urma iradierii cu UV-A, valorile indicatorilor pentru BRM nu au fost modificate, în timp ce pentru TPS s-a constatat o scădere a sensibilității (Sb=44%) și a VPN (46%), prin creșterea numărului de pacienți cu valori fals negative (FN=21).

Interpretarea corelată a ambilor markeri a dus la următoarele rezultate: Sb=87%, Sp=83%, VPP=54% și VPN=77%. Constatăm astfel o creștere a specificității în cazul determinării simultane și a interpretării corelate a ambilor markeri.

Concluzii

Din studiul efectuat putem concluziona următoarele:

- Nu se recomandă recoltarea markerilor tumorali după efectuarea preanesteziei în vederea intervenției chirurgicale, deoarece, conform rezultatelor noastre, se înregistrează un număr mare de valori fals pozitive în aceste condiții (stres preoperator, medicație).

- Serul din proba recoltată de la pacient trebuie obținut în cât mai scurt timp și păstrat la frigider până la efectuarea determinării, pentru a evita o posibilă acțiune a radiațiilor UV-A și o creștere a determinărilor fals negative.

- În cazul determinării BRM simultan cu TPS, se obține o ameliorare a indicatorilor față de utilizarea separată doar a TPS sau BRM (CA 15-3). Analiza simultană a celor doi markeri duce la o creștere sensibilă a VPN, ceea ce ne îndreptățește să afirmăm necesitatea utilizării ambelor teste în monitorizarea evoluției pacienților cu neoplasm mamar.

Bibliografie

1. Cole C. – Sunscreen protection in the ultraviolet A region: how to measure the effectiveness. – *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* (2001) 17: 2-10.
2. Hu XC, Day W, Jones B, Loo WT, Chow LW., – Comparison of TPS with CEA and CA 15.3 in follow-up of Chinese breast cancer patients – *Anticancer Res* (2002) May-Jun; 22 (3): 1865-8.
3. Kielbassa C., Roza L., Epe B. – Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. – *Carcinogenesis* (1997) 18: 811-816.
4. Kumpulainen EJ, Keskikuru RJ, Johansson RT – Serum tumor marker CA 15.3 and stage are the two most powerful predictors of survival in primary breast cancer – *Breast Cancer Res Treat* (2002), 76(2): 95-102.
5. Scarlat E. I., Preda L., Scarlat M. et al, – The influence of UV-A laser radiation upon the cancer markers TPS and CA15-3 – *Journ. of Optoelect. and Adv. Mat.*, (2007) 4.
6. Scarlat M., Jînga D., Blidaru Al. et al, – CA 15-3, marker de prognostic în cancerul mamar – A III-a Conf. a Fundației de Laborator Clinic “Marcela Zamfirescu Gheorghiu”, (2004) Oradea.

Lista abrevierilor

BRM	Antigenul cancerului de sân (CA 15-3)
TPS	Antigenul polipeptidic specific tisular
UV-A	Radiația ultravioletă din spectrul A
Sb	Sensibilitatea
Sp	Specificitatea
VPP	Valoarea predictivă pozitivă
VPN	Valoarea predictivă negativă
AP	Adevărat pozitive
FN	Fals negative
AN	Adevărat negative
FP	Fals pozitive