

Informationsmaterial om DiviTum TK, en celltillväxttest från Biovica International AB

2009-09-01

Kort bakgrund	2
Den nya mätmetoden DiviTum TK.....	2
Orsaker till patologiska TK-nivåer.....	3
Transienta förhöjningar	3
Trauma	3
Infektion	3
Kemoterapiinducerad tumörcellsdöd	4
Kemoterapiinducerad interferens med de-novo synteskedjan	5
Permanent förhöjningar	5
Vitamin B ₁₂ -brist	5
Autoimmuna sjukdomar	5
Cancer.....	6
Begränsningar i DiviTum TKs användning	6
Normalnivåer.....	6
Studie hos blodgivare – interpersonell varians	6
Intrapersonell varians	9
Provtagningsprotokoll	10
Hur skall prover tas?	10
När skall prover tas?.....	10
Vad säger resultaten?	11
I samband med PSA	11
Generell hälsokontroll	12
Kontaktinformation	12

kan upptäcka 10 ggr mindre massa av delande celler vilket nu breddar användningen av s-TK mätningar även till solida tumörer.

Eftersom korrelationen mellan DiviTum TK och TK-REA är så stark har vi valt att inte repetera tidigare publicerade studier utan fokus har satts på nya tillämpningar. Dock skall noteras att den nya tekniken har en annan gradering och TK aktiviteten anges därför som DiviTum TK units per liter (Du/L). 1000 Du/L motsvarar den aktivitet som erhålles i systemet med ett 10 µl prov som innehåller 1000 ng/L av rekombinant human TK1-enzym.

Orsaker till patologiska TK-nivåer

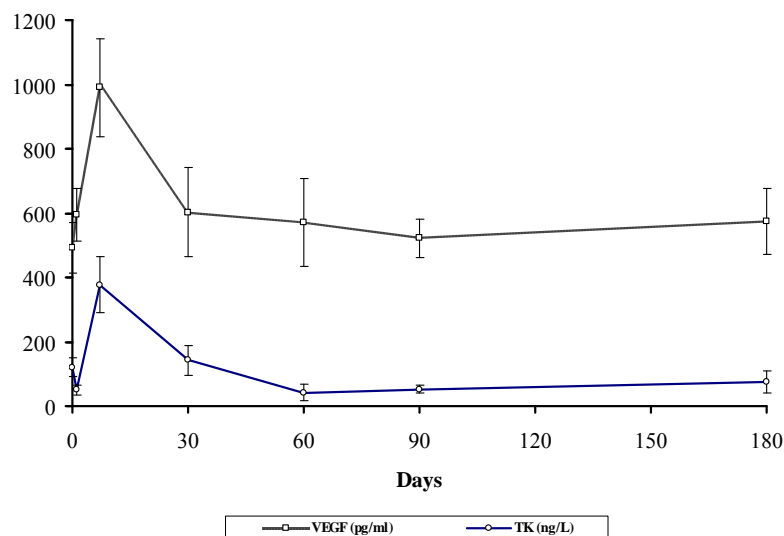
Liksom alla biomarkörer varierar s-TK aktiviteten i blodet över tid. Vissa förändringar är transienta till sin natur och vissa är permanenta.

Transienta förhöjningar

Trauma

Kortsiktiga transienta förhöjningar har observerats efter trauma från operation. Varaktigheten och storleken på dessa förhöjningar är beroende på traumats omfattning. Halveringstiden för s-TK i blod är cirka 2 dagar vilket innebär att nivåerna snabbt klingar av efter att sår-läkningsprocessen är klar. I Figur 2 ses effekten av nefrektomi på en patient. Denna bild är representativ och visar att s-TK faller till normala värden efter två månader för denna typ av ingrepp.

Trauma induced s-TK post kidney removal



Figur 2. Den undre kurvan visar s-TK's förlopp efter nefrektomi. Denna bild är en del av dokumenteringsarbetet av DiviTum TK och är under publikation och bör behandlas i enlighet med det.

Infektion

Även vissa infektioner leder till transient förhöjd s-TK-aktivitet vilket normaliseras inom några veckor. För en grafisk illustration på detta hänvisar vi till en äldre studie i Fig. 3.

Primär Herpes simplex typ I och II, Epstein-Barr virus och Varicella Zoster-infektion, Rubella och mässling kan alla ge en tillfälligt förhöjd s-TK-aktivitet som dock normaliseras efter 3-5 veckor. Dock förväntas pga den tiofaldigt ökade känslighet med DiviTum TK att även andra infektioner samt kraftiga allergireaktioner ge tillfälliga moderata s-TK förhöjningar, i relation till behov av nycellsbildning. Detta eftersom kroppen snabbt nybildar och ersätter konsumerade celler.

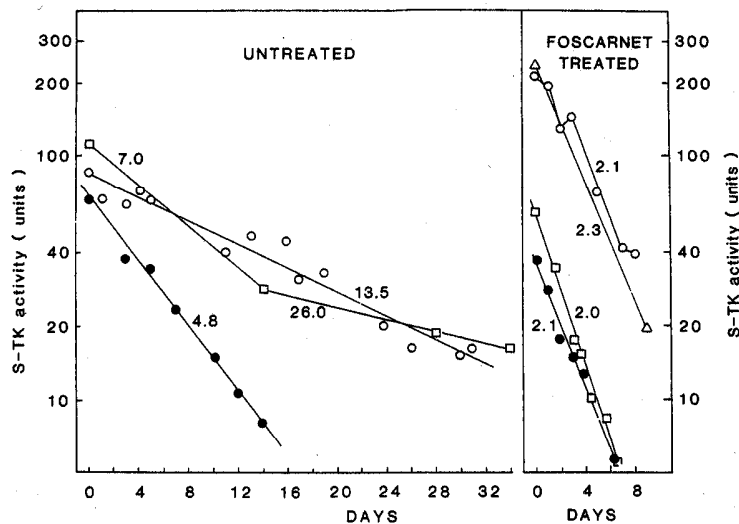
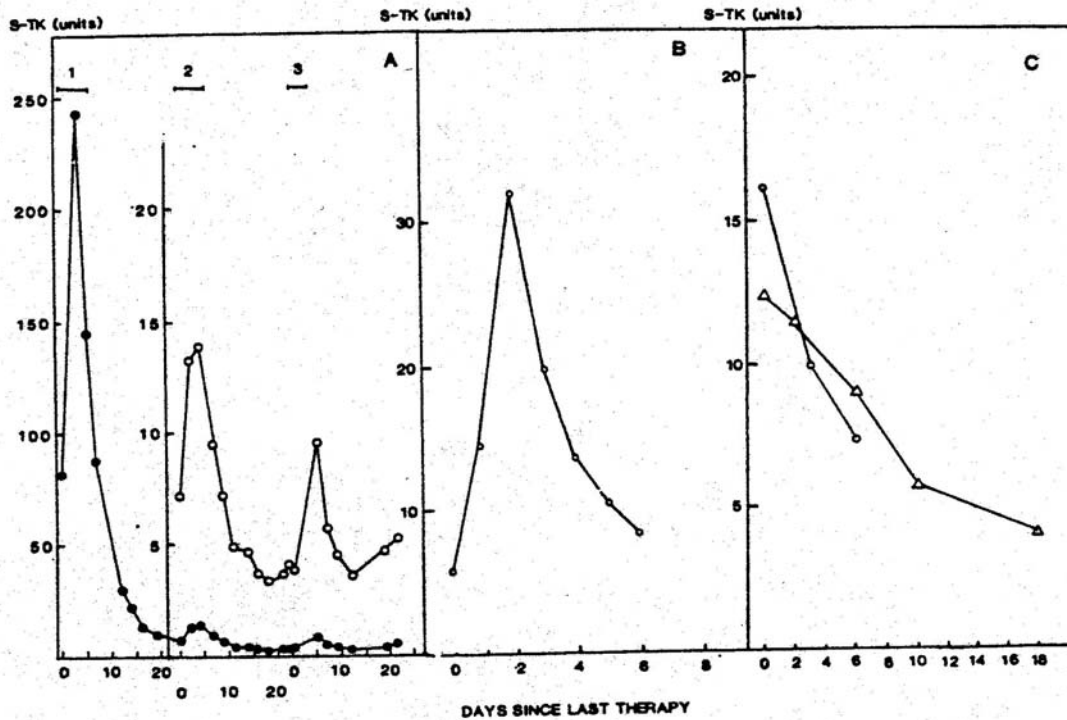


Fig. 2. The half-life of serum thymidine kinase (S-TK) activity in self-healing and foscarnet treated cytomegalovirus infected transplant patients. (Left lane) Untreated patients. Day 0 indicates only the first day the S-TK started to decrease. ●-●-● and ○-○-○ are renal recipients, and □-□-□ is a bone-marrow transplant patient. (Right lane) Foscarnet treated patient. Treatment started at day 0. ○-○-○ and □-□-□ renal recipients. ●-●-● and △-△-△ bone-marrow recipients. Numbers in the figure indicate $t_{1/2}$ for S-TK calculated from the lines.

Figur 3. (Gammal TK-assay)

Kemoterapiinducerad tumörcellsdöd

Cytostatika som dödar tumörceller i delning leder till förhöjda värden med en halveringstid om cirka två dagar. För illustration av detta fenomen lutar vi oss återigen mot studier utförda med den gamla tyimidinkinas metoden TK-REA. Se Fig. 4.



Figur 4. Vänster: Intermittent behandling av leukemi med POCAL (behandlingsperioder markerade med 1,2 och 3 i figurens överkant). Mitten: s-TK utveckling över en behandlingskur mot koloncancer. (Höger: För behandling av prostatacancer med estracyt samt behandling av leukemi med interferon uppstår inga induktionstoppar.) (Gammal TK-assay.)

Kemoterapiinducerad interferens med de-novo synteskedjan

Långvariga transienta förhöjningar av s-TK uppkommer vid behandling med läkemedel som interfererar med tymidylatsyntetas och folsyra och i sådana fall sker inte normalisering förrän behandlingen avslutas. Detta gäller substanser som 5-fluoro-uracil, metotrexat, pemetrexed (Alimta).

Permanenta förhöjningar

Vitamin B₁₂-brist

Kroniskt förhöjda värden uppstår vid svår B₁₂-brist (folat) som resulterar i megaloblastanemi. Normalisering erhålles, med två dagars halveringstid av s-TK-aktivitet, efter injektion av vitamin B₁₂. Noteras kan att individer med glutenintolerans samt andra tarmsjukdomar som resulterar i dåligt B₁₂ upptag kan ha stor varians i sitt s-TK betingad av hur dieten hålls.

Autoimmuna sjukdomar

Autoimmuna sjukdomar med förhöjd cellomsättning resulterar i permanent förhöjda s-TK-nivåer, framför allt rapporterad för reumatisk artrit med den gamla okänsliga TK mättekniken. Dessa data indikerar att DiviTum TK bör kunna användas vid behandlingsuppföljning så länge ej metotrexat eller 5-FU ingår.

Cancer

Vid tumörsjukdomar uppstår per definition patologiska nivåer när mängden delande celler är så stor att den resulterar i en signifikant höjning av s-TK-aktiviteten över normalnivån.

I kontrast till saktväxande solida tumörer föreligger t.ex. vid leukemi nästan alltid mycket kraftigt förhöjd s-TK-aktivitet 10 000- 100000 Du/L vid upptäckt av sjukdom.

Sammanfattningsvis konstaterar vi att saktväxande solida tumörer bör kunna upptäckas med imaging redan vid förhållandevis låg s-TK ökning uppmätt med DiviTum TK, eftersom normala s-TK nivåer mycket väl kan föreligga vid nyupptäckt sjukdom. Däremot om s-TK förhöjningen är moderat och beror på tex NHL kan svårigheter föreligga att lokalisera härden. Vid upptäckt av solida tumörer pga symptom så har dessa ofta metastaserat och ger därför med få undantag, säkert förhöjda s-TK nivåer (>100 ->>100 Du/L) med DiviTum. Därför rekommenderas DiviTum test vid primärutredning av sjukdom av okänd etiologi, såväl som vid kontroll av patienter efter genomgången botad cancer. Tex har konstaterats att s-TK nivån ökar till ca 200Du/L innan symptom på återfall föreligger hos kvinnor opererade för ER positiv bröstcancer som Tamoxifen behandlats. För kvinnor opererade för ER-negativa tumör hittas enda upp till 2000 Du/L innan återfallet manifesterar sig med kliniska symptom. Dvs stigande DiviTum värden vid efterkontroll av ”botade” cancerpatienter indikerar att patienten snarast skall kontrolleras för återfall.

I terminala skeden av olika cancertyper illustreras dessa skillnader i omsättningshastighet av tumörceller i förhållande till total tumörvolym av att patienter ofta dör av prostatacancer med värden väl under 10.000 Du/L medan patienter som dör av akut leukemi ofta har 100.000 Du/L eller mer. Serum-TK expression och dess användbarhet inom klinisk onkologi finns väl beskriven med den tidigare okänsliga tekniken för i stort alla hematologiska maligniteter, småcellig lungcancer, samt i begränsade omfattning indikerad för en del solida tumörer (vidare info från Biovica se även vår hemsida, www.biovica.com).

Begränsningar i DiviTum TKs användning

Av ovan följer att vid autoimmuna sjukdomar samt under pågående kemoterapi med substanser som 5-fluoro-uracil, metotrexat, pemetrexed (Alimta) föreligger tolkningsproblem avseende cancer aktivitet och DiviTum TK bör därför undvikas i dessa situationer. Dock vid autoimmunsjukdom med s-TK förhöjning, utan cancerfrågeställning, bedöms testen kunna ge information avseende effekt av terapiintervention.

Vid förhöjt s-TK värde skall transienta orsaker alltid uteslutas. Om megaloblastanemi pga B12-brist misstänkts bör detta utredas, i övrigt skall transient förhöjda värden uteslutas genom uppföljningsprov för ny s-TK analys efter cirka 3-4 veckor.

Notera skall att prov för hälsokontroll endast bör tas när individen varit frisk de senaste 3-4 veckorna

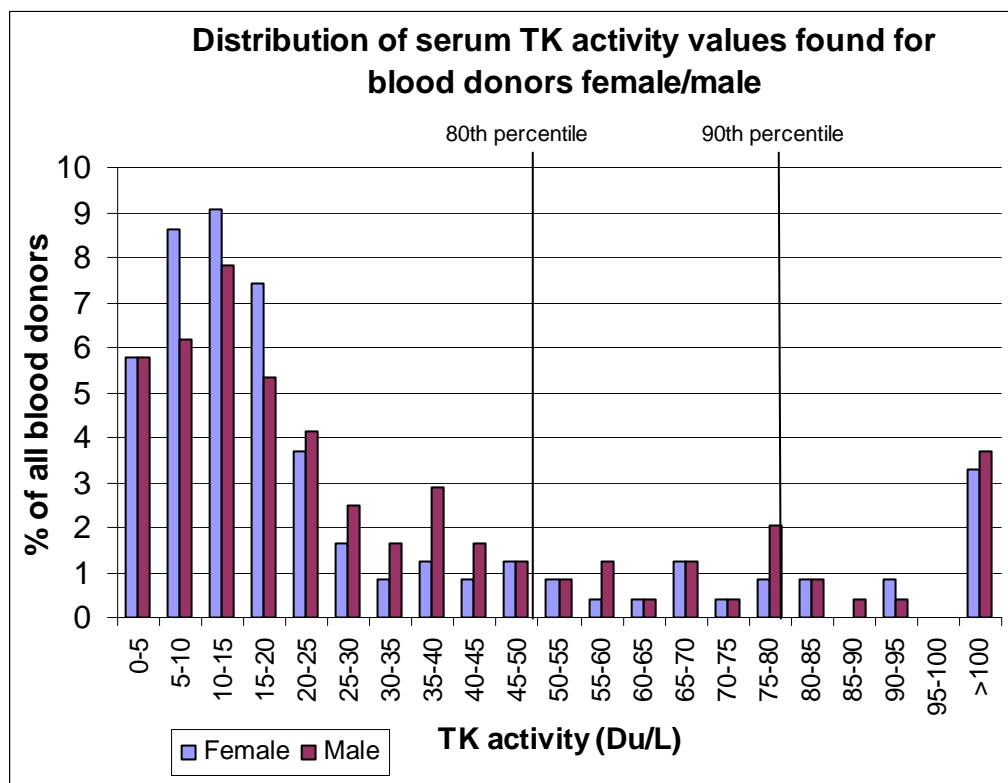
Normalnivåer

Studie hos blodgivare – interpersonell varians

Eftersom blodgivare kan anses vara i övrigt friska har Biovica genomfört en första studie på 243 blodgivare jämt fördelade över könen och ålders i intervallen mellan 19 och 80 års ålder. Studien utfördes med avkodade prover varför sekundärprov för uteslutande av transient förhöjning saknades dessutom kunde ej förekomsten av okänd cancer vid

provtagningstillfället analyseras genom uppföljning (viktigt eftersom hälften av blodgivarna var äldre än 50 år).

S-TK distributionen för hela kohorten är visad i Figur 5 och Tabell 1, för rekommenderade normalintervall i Figur 6, medan hela gruppen plus 40 års ålder (n=160) redovisas i Figur 7.



Figur. 5 (DiviTum TK assay)

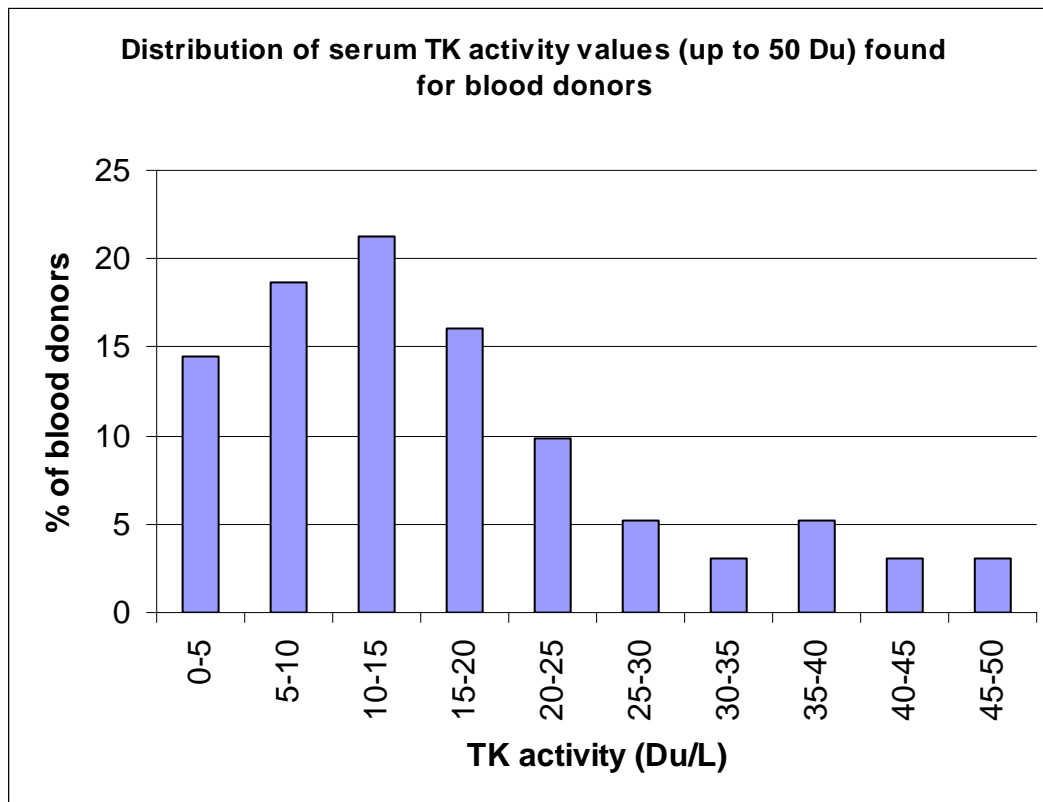
Från Figur 5 och Tabell 1 framgår att ingen signifikant skillnad föreligger mellan män och kvinnor ej heller för ålder inom intervallen 18-80 år. Konventionellt används normalt 90% percentil för definition av övre normalgränsen hos friska avseende olika biomarkörer. Eftersom halva kohorten av blodgivare var över femtio år och statistiskt skall innehålla ett antal individer som redan bär tumörer vilka ännu ej givit symtom samt att transienta förhöjningar av icke malign orsak ej kunnat uteslutas så har vi med hänvisning till försiktighetsprincipen valt att använda 80% percentil som övre gräns för normalitet. Detta i avvaktan på att öppna studier blir klara med blodgivare. Figur 6 visar distributionen av TK värden i ”normal intervallen” upp till 50Du/L

Tabell 1. Serum-TK aktivitet i relation till ålder.

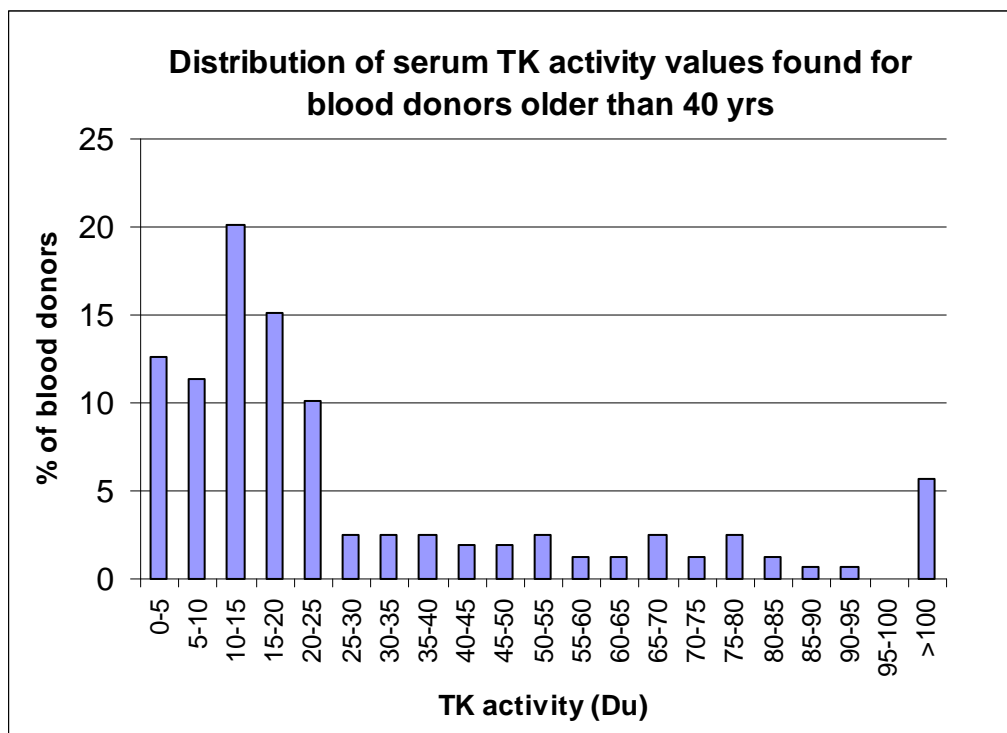
Serum-TK mätt med DiviTum TK i förhållande till ålder hos blodgivare

Ålder (år)	Medel Du/L	Median Du/L
18-24	59,3	23,4
25-29	30,5	17,6
30-34	32,0	13,9
35-39	45,3	29,1

40-44	33,7	16,8
45-49	29,8	15,3
50-54	38,3	14,1
55-59	95,5	18,3
60-64	17,9	11,8
65-69	23,9	19,3
70-74	55,3	35,5
75-80	21,8	21,6
Alla	40,3	17,5
alla >40 år	42,1	16,8



Figur 6. (DiviTum TK assay)



Figur 7. (DiviTum TK assay)

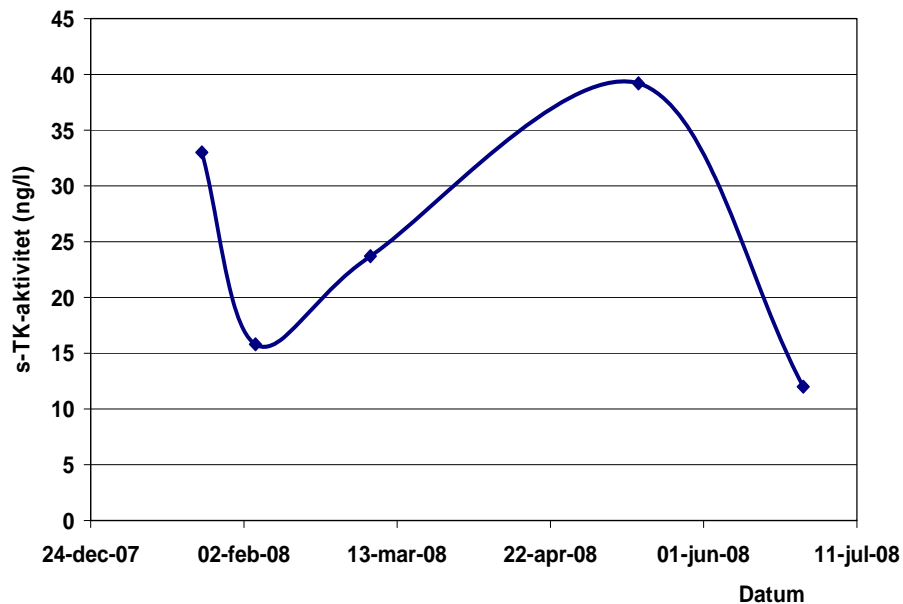
Som framgår från Figur 5 förelåg i stort samma distribution av s-TK värden för kvinnor som män. Förhöjda s-TK nivå förelåg både hos unga och gamla. I Figur 7 redovisas s-TK distribution för personer med ålder från 40-80 år (n=160) som referens för PSA positiva och hälsokontroll

Ur fördelning över s-TK-aktivitet (Figurer. 5,6,7, Tabell 1) kan man se att ca 80% av alla deltagare i blodgivarstudien hade [s-TK] < 50 Du/L, samt att ingen säker skillnad i s-TK finns i ålders intervallen 18-80 år oavsett kön. Beträffande vad som bör klassas som en brytpunkt mellan normal och något förhöjt är det intressant att notera att det i denna analys finns inbakat transienta förhöjningar (även pga intrapersonell variation över tiden) och okänd cancer bortom Biovicas kontroll (sluten studie). Om man tagit uppföljningsprov på nivåer långt över medianvärdet för 40-80 åringarna (som i studien var 17 Du/L) hade man sett ett skift i distributionen till vänster som skulle motivera användning av standard 90%-percentil. Från resultaten och variansen beskriven nedan samt utifrån försiktighetsprincipen använder vi 80% percentilen 50Du/L för definition av övre normalgräns, dvs att värden under 50 kan betraktas som helt normala, medan 50-70 utgör en gråzon och värden därutöver bör alltid utredas med avseende på transient eller kronisk förhöjning. Noteras kan att normalgränsen i gammal TK assay motsvarar 400-500 Du/L, dvs ca 10 ggr mindre tumörcelledelning kan detekteras med DiviTum TK.

Intrapersonell varians

Den intrapersonella variationen är mindre än den interpersonella. Biovica har inte genomfört några långtgående studier på detta, men Figur 8 visar ett typfall hos en frisk individ som följts med DiviTum TK under fem månader. Medelvärde över perioden är 25 Du/L standardavvikelsen mellan observationerna är 11 Du/L. Ännu lägre variation är inte ovanlig.

För att säkerställa ökning över tid och tydligare klarlägga intrapersonell variation har Biovica för avsikt att tills vidare alltid analysera närmaste föregående prov med det nya provet insänt för varje person.



Figur 8. Intrapersonell variation över tiden. (DiviTum TK assay)

Provtagningsprotokoll

Baserat på gjorda observationer har Biovica utarbetat ett provtagningsprotokoll som anger när och hur prover skall tas.

Hur skall prover tas?

- Alla prover skall vara standard serumprover och skall frysas (-18 °C) så fort som möjligt efter att koaglet har avlägsnats.
- Prover skall inte utsättas för temperaturer över +30°C i mer än en timme för att förhindra att enzymet inaktiveras.
- 200 mikroliter serum behövs (>0,5 ml önskvärt)
- Prov skall vara tydligt märkt med patientens data, samt åtföljas av väl ifylld remiss som enklast laddas ned från vår hemsida www.biovica.com (Remissblock utsänds även på begäran info@biovica.com)
- För transport se baksida remissblankett

När skall prover tas?

Vid Hälsokontroll

- Prover skall tas när patienten har varit utan infektion/kraftig allergireaktion eller andra sjukdoms symptom de senaste tre veckorna.
- Om patologiska värden erhålls (>70 Du/L) skall ett nytt prov tas inom tre till fem veckor för att utesluta transient förhöjda värden. (Kostnaden för utförandet av uppföljningsprovet kommer inte att debiteras av Biovica.)
- Om värde i gräzon 50-70 Du/L rekommenderas kontrollprov efter 2-3 månader

- Om värde lägre än 50 Du/L nytt prov vid nästa årskontroll

Vid symptom- och sjukdomsutredning tas prov i akut fas ihop med övriga prov för utredning

Vad säger resultaten?

Biovica föreslår initial användning av s-TK som beslutstöd vid upptäckt av patologiskt PSA värde hos friska herrar utan miktionsproblem, samt som kompletterande test vid utredning av kronisk trötthet och aptitförlust med viktminskning, samt för bruk i generell hälsokontroll. Dessutom rekommenderar vi alltid användning inom primärvården vid sjukdomsutredning om misstanke/möjlighet för cancer föreligger. Då ihop med övriga kliniska parametrar som stöd för vidare remittering av patient.

I samband med PSA

1) Vid konstaterande av förhöjd PSA i intervallen 3-20ng/L hos frisk herre utan miktionsproblem, dvs asymptomtisk, motiverar s-TK värden under 30 Du/L att man avvaktar med nålbiopsi och tar nytt prov efter 9-12 månader. Om värde då fortfarande är under 30 Du/L avvaktar man ytterligare 9-12 månader osv.

Om värde större än >30 Du/L < 50 Du/L nytt prov i friskt tillstånd efter ca 3-4 månader, om provet då högre än tidigare så rekommenderas nålbiopsi för fastställande av diagnos.

Vid prostata utredning orsakad av miktionsproblem med eller utan PSA förhöjning rekommenderas användning av befintliga rutiner. Dock motiverar ett högt s-TK förtur och snabb utredning/undersökning. Vid Gleason score 5-7 och moderat PSA förhöjning (3-20), samt s-TK <30 så förfaller det lämpligt att avvakta med ektomi tills stigande s-TK konstateras. Lämplig serumprovtagning intervall 6-8 månader.

Vid konstaterade prostatacancer är hög s-TK-aktivitet starkast som komplement för PSA-värden mindre än 20 ng/ml (där PSA korrelerar dåligt med tumorspridning). Sannolikheten för fynd av metastaser är extremt låg (<4%) vid normala s-TK värden under 30 Du/L, och ökar ju högre s-TK (se tabell 2). Här kan s-TK, utöver patient och läkarnyttan, ge en kraftigt resursstyrande effekt och kostnadsbesparing genom att patienter in undersöks i onödan med kostsamma förfaranden.

Ovanstående rekommendationer och slutsatser baserar sig på nedanstående resultat från pågående studier av retrospektivt samlat serumaterial.

Tabell 2. S-TK distribution vid förhöjd PSA med eller utan prostatacancerdiagnos. (DiviTum TK assay)

DiviTum Du/L	number pc-pos	number pc-neg	% pos in interval	% of total in interval	n pos scint of examined
<30	66	118	36	51	0/24
30-50	23	37	38	17	1*/10
50-80	14	20	41	9	0/9
80-125	14	18	44	9	0/9
>125	22	25	47	13	6/12
Total	139	218	358	100	

* value 45 Du/L

Metastasering av prostatacancer till skelett har enbart kunnat påvisas för patienter med s-TK-aktivitet över 125 Du/L (se tabell 2). (En uteliggare fanns där bescintigrafiundersökningen indikerade metastasering vid 45 Du/L, men så låga s-TK har vi inte sett vid några andra metastaserade cancrar varför vi ifrågasätter om det verkligen var ett sant positivt fynd.)

Vid utredning av trötthet med aptitförlust och viktninskning.

S-TK värden <50 Du/L talar starkt emot att symptomen är orsakade av en växande cancer.

Generell hälsokontroll

Om permanent förhöjda värden erhålles, och tillstånd beskrivna under avsnittet *Orsaker till patologiska TK-nivåer* kan uteslutas, kan en tumördiagnos misstänkas.

Kontaktinformation

Vid frågor på detta material, kontakta i första hand Simon Gronowitz på:

Biovica AB

Uppsala Science Park

Dag Hammarskjölds väg 32 B

751 83 Uppsala

Tel: 018-57 24 29

e-post: simon@biovica.com

Mobil: 076-2418166

Övrig info www.biovica.com