

**UNIVERZITA KARLOVA PRAHA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI**

BIOMARKERY V ONKOLOGII

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

Editor:

Doc. RNDr. Judita Kinkorová, Ph.D.

Sponsored by OP VK CZ.1.07/2.3.00/20.0040

Autoři :

Doc. MUDr. Juraj Kaušitz , CSc.

Prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc

RNDr Marie Karlíková Ph.D.

MUDr. Šárka Svobodová, Ph.D.

Josep Augé Fradera

Prof. Vivien Barac

Zdena Bartošová

Vincenzo Costigliola

Eva Kaušitzová

Lujza Sabolová

Luboslav Sanislo

Katarína Závodná

Mária Zezulová

Vydalo nakladatelsví Tribun 2014

ISBN 978-80-263-0820-1

Úvod

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

Diagnostické využití biomarkerů

Rozdělení a obecná charakteristika biomarkerů

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

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

Požadavky kladené na ideální nádorový marker jsou následující:

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

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

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

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

Tabulka č. 5. Rozdělení nádorových biomarkerů podle funkce:

Skupina markerů:		Jednotlivé markery.
Onkofetální a mucinózní antigeny	Mající funkci u plodu	<ul style="list-style-type: none"> • CEA • AFP • hCG • SP1
	Karbohydrátové(cancer) antigeny	<ul style="list-style-type: none"> • CA 125 • CA 15-3 • CA 19-9 • CA 50 • CA 72-4
Cytokeratinové nádorové markery		<ul style="list-style-type: none"> • TPA • TPS • CYFRA 21.1 • SCC
Enzymy	Proliferační	<ul style="list-style-type: none"> • Neuronspecifická enoláza • Thymidinkináza
	Ostatní	<ul style="list-style-type: none"> • Prostatický specifický antigen • Kyselá prostatická fosfatáza • Laktátdehydrogenáza
Hormony	Ektopická sekrece	<ul style="list-style-type: none"> • Adrenokortikotropní hormon • Antidiuretický hormon • Kortizon • Parathormon • Prolaktin
	Produkované nádorem	<ul style="list-style-type: none"> • Placentární laktogen • Kalcitonin • Parathormon • Prolaktin
Receptory		<ul style="list-style-type: none"> • Estrogenové • Progesteronové
Ostatní blíže nespecifikované látky		<ul style="list-style-type: none"> • Feritin • β_2-mikroglobulin • Imunoglobuliny

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

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

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

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

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

Poslední skupinu nádorových markerů tvoří nejrůznější tkáněmi produkované **blíže nespecifikované látky**, které se nedají zařadit do žádné z předchozích skupin, ale při nádorovém bujení se jejich hladiny v krvi zvyšují jako nespecifická reakce organismu na přítomnost nádorového onemocnění (ferritin, β_2 -mikroglobulin, imunoglobuliny).

Charakteristika vybraných biomarkerů

CEA (karcinoembryonální antigen)

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

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

Tabulka č. 6. Zvýšené hodnoty CEA:

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

Tabulka č.7. Referenční hodnoty CEA:

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

Nádorové markery mucinózní

CA 19-9

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

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

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

Tabulka č.8. Zvýšené hodnoty CA 19-9:

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

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

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

PSA

Základní charakteristika

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

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

Chemická struktura

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

Tvorba, metabolismus, vylučování, funkce

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

Biologický poločas

PSA- 2-3 dny

Preanalytika

Materiál: sérum

Vliv materiálu: vadí hemolýza

Vliv denních a jiných cyklů:

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

Vliv léků: inhibitory 5alfa reduktázy

Další vlivy: manipulace s prostatou

Proliferativní nádorové markery

TK (thymidinkináza)

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

listové a vitamínu B₁₂. Thymidinkináza na rozdíl od thymidylátsyntetázy používá jako substrát buď exogenní thymidin z potravy nebo endogenní thymidin uvolněný z odbourávacích reakcí. Je označována také jako "salvage enzyme" (záchranný enzym). TK je nespecifický nádorový marker schopný zachytit maligní růst v různých orgánech.

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

Tabulka č. 10. Zvýšené hodnoty TK:

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

Tabulka č. 11. Referenční hodnoty TK:

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

Fragmenty cytokeratinu

Jde o cirkulující komplexy fragmentů **cytokeratinů 8, 18, 19**, které se vyskytují jak v normálním epitelu (jednoduchý, žláznový, vývodový, přechodný apod.) tak v nádorových buňkách odvozujiících se od tohoto epitelu (mléčná žláza, plíce, ovarium, střevo, trachea, močový měchýř, pankreas, většina endokrinních žláz, prostata apod.). Jsou pak prokazovány protilátkami různě označovaných testů.

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

Tabulka č. 12. *Reaktivita různých testů proti fragmentům cytokeratinu*

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

TPA (tkáňový polypeptidický antigen)

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

Výskyt : Fyziologicky je TPA (společně s TPS) produkován trofoblastem placenty, a dále v játrech, plicích, střevě a ledvinách vyvíjejícího se plodu. U zdravých dospělých

je možné oba markery zjistit v epiteliální výstelce vývodů mléčné žlázy, močového měchýře, v plicích a v orgánech trávicího traktu.

Tabulka č. 13. Zvýšené hodnoty TPA:

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

Tabulka č. 14. Referenční hodnoty TPA:

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

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

TPS (tkáňový polypeptidický specifický antigen)

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

Tabulka č. 15. Zvýšené hodnoty TPA:

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

Tabulka č. 16. Referenční hodnoty TPS:

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

Matrix metaloproteinázy:

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

Tabulka č. 17. Přehled jednotlivých skupin matrix metaloproteináz

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

Dříve byla úloha matrix metaloproteináz spojována pouze s degradací bazální membrány extracelulární matrix. V poslední době se ukazuje, že matrix metaloproteinázy mají v procesu růstu nádoru a metastazování mnohem komplexnější úlohu. Degradací bazálních membrán kompartmentových systémů ovlivňují nejen invazi nádoru do bezprostředního okolí, či intra a extravazaci nádorových buněk, ale ovlivňují také migraci buněk v místě tvorby vzdálených metastáz. Hrají též významnou úlohu v procesu angiogeneze a to vytvářením prostoru pro nově vznikající cévy, podporou mobility endotelií a invazí buněk nádoru do cév. U pacientů s kolorektálním karcinomem byly patologické hodnoty proteináz MMP-1, MMP-2 a MMP-7 spjaty s výskytem metastáz, v případě MMP-1 korelovaly hodnoty s Duksovou klasifikací a stupněm postižení lymfatických uzlin. U pacientů

se stadiem Dukes C a D se metaloproteinázy MMP-1 a MMP-7 jeví jako nezávislý prognostický faktor nepříznivé prognózy.

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

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

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

Adhezivní molekuly

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

Tabulka č. 18. Přehled jednotlivých skupin adhezivních molekul:

Adhezivní molekuly	
Skupina	Druh
Integriny	β_1 - β_8
Selektiny	E-selektin, P-selektin, L-selektin
Imunoglobuliny	Intercellular adhesion molecules: ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 Vascular cell adhesion molecules: VCAM-1
Kadheriny	E-kadherin, P-kadherin, N-kadherin
Ostatní	CD 22, CD 24, CD 44, CEA

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

Faktory regulující angiogenézu

Angiogeneze je proces, při kterém primitivní vaskulatura expanduje a nemodeluje se. Tím dochází k novotvorbě cév, které se mohou vzájemně propojovat a větvit, čímž dochází ke zralému cévnímu systému. Jedná se o vícestupňový proces (angiogenní kaskáda), který je regulován řadou faktorů. Za fyziologického stavu jsou faktory podporující angiogenezi v dynamické rovnováze s faktory, které ji potlačují (angiogenní a antiangiogenní faktory). Endotheliální buňky tedy samy o sobě pro novotvorbu cév nestačí a pro kompletní novotvorbu je nezbytná jejich součinnost s peri-endoteiálními buňkami a matricí.

U dospělého jedince je angiogeneze vysoce potlačena a jen asi u 0,01 % endoteliálních buněk probíhá dělení. Většina nádorů u lidí perzistuje in situ po dlouhé měsíce až roky bez známek cévní novotvorby. Neovaskularizace začne, jakmile nádorové ložisko dosáhne velikosti 1-2 mm³ (asi 10⁶ buněk) a přívod kyslíku a živin prostou difúzí přestává pro výživu buněk a jejich dělení stačit. Limitace zásobení živinami udržuje rovnovážné tempo mezi replikujícími a zanikajícími buňkami, kdy je po určitou dobu proliferace v rovnováze s apoptózou. Hypoxický nádor je však geneticky nestabilní, vznikají v něm četné mutace (např. mutace genu p 53, která vede k potlačení produkce antiangiogenního trombospondinu). Objevuje se nový fenotyp se zvýšenou produkcí VEGF a dalších angiogenních faktorů (tzv. TAF-tumor angiogenesis factors). Tato změna je označovaná též jako „angiogenní switch“. Angiogenní zvrát zahrnuje změnu lokální rovnováhy mezi stimulatory a inhibitory růstu mikrocév. Nádorové buňky mohou vytvářet zvýšené množství jednoho či více stimulatorů, mobilizovat angiogenní faktory z extracelulární matrice, či stimulují k jejich produkci buňky hostitelského organismu jako např. makrofágy, či se jedná o kombinace těchto různých vlivů. Mezi nejčastěji prokázané stimulatory patří bFGF a VEGF, ale v nádorových tkáních byla prokázána celá řada dalších faktorů. Nadprodukce angiogenních faktorů není však dostačující, musí rovněž dojít k supresi inhibitorů, které za normálních okolností brání endotel před mitogenními stimuly. Proliferace je rovněž regulována pericyty (produkce mitogenů, či snížení senzitivity k růstovým faktorům).

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

Tabulka č. 19. Přehled angiogenních a antiangiogenních faktorů

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

Z klinického pohledu neovaskularizace umožňuje nádoru růst a metastazování, což často vede ke klinické symptomatologii nádorového onemocnění. Většinou nádory začínají být klinicky zřejmé až po angiogenním zvratu, ale to rovněž neznamená, že to povede k rychle rostoucímu nádoru. Za určitých okolností mohou být také

vzdálené metastázy suprimovány cirkulujícími inhibitory z primárního ložiska a začnou růst až po jeho odstranění. Paradoxně, neovaskularizace snižuje schopnost průniku chemoterapeutik do nádoru. Zatímco nádory menší než 1 cm (v počátečním stadiu neovaskularizace) jsou dobře prokrveny, větší nádory jsou díky útlaku cév prokrveny hůře. Útlak je způsoben zvýšeným intersticiálním tlakem při zvýšené permeabilitě nově tvořených cév a sníženým počtem lymfatické drenáže, což vede často k centrálním nekrotickým zónám. Proto také není překvapující, že antiangiogenní látky snížením intranádorového tlaku zlepšují dostupnost chemoterapie.

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

Z předchozího výkladu vyplývá, že existuje úzký vztah mezi angiogenezí a tvorbou metastáz. Čím je angiogeneze intenzivnější, tím je riziko metastáz větší a prognóza nádorového onemocnění horší. I v případě kolorektálního karcinomu bylo prokázáno, že intenzita angiogeneze v marginálním okraji nádoru koreluje s prognózou nádorového onemocnění. Z angiogenních faktorů je nejintenzivněji studován endoteliální růstový faktor VEGF. Sérové hodnoty VEGF korelují u pacientů s kolorektálním karcinomem s nepříznivou prognózou a tato korelace je nezávislá na výskytu vzdálených metastáz (Dirix, 1999). Nepodařilo se prokázat, že se jedná o nezávislý prognostický faktor. Z dalších prováděných studií publikoval Shimoyama a kol. (Shimoyama 1999) signifikantně vyšší hodnoty angiogeninu u pacientů s kolorektálním karcinomem ve stadiu Dukes C ve srovnání se skupinou pacientů ve stadiu Dukes A. Sérové hodnoty signifikantně korelovaly s histologickým průkazem angiogeninu v nádorové tkáni. Různé mechanismy inhibice angiogeneze mohou být v budoucnu přínosem v terapii nádorového onemocnění a výsledky prvních klinických studií jsou povzbudivé. Dle místa účinku se jedná o tři hlavní skupiny terapeutik:

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

Faktory apoptózy

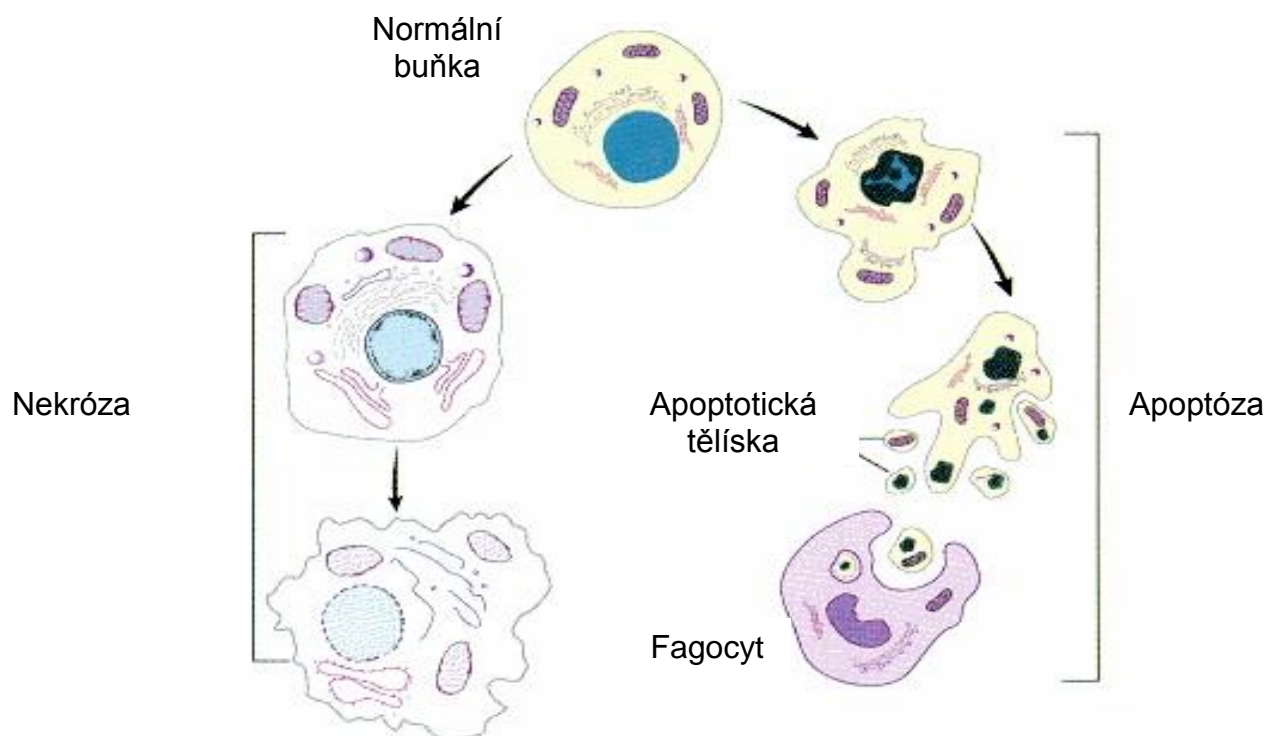
Růst nádorových buněk je podmíněn nejen nekontrolovatelným buněčným dělením, ale také zvýšenou schopností přežít. Většina nádorových buněk získala rezistenci vůči mechanismům vedoucím k jejich programovanému zániku – apoptóze. Narušení signalizace apoptózy je obecným předpokladem existence a rozvoje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

Je nutné velice důsledně rozlišovat mezi dvěma ději – nekrózou a apoptózou.

Nekróza je patologický proces, kdy dochází k nekontrolovanému, náhlému a chaotickému zániku buněk. Dochází při ní k dilataci endoplasmatického retikula, alteraci mitochondrií, zduření buňky a následně k ruptuře plazmatické membrány.

Tím dochází k definitivnímu zániku buňky. *Apoptóza* je fyziologický proces, kdy dochází ke kondenzaci chromatinu, segmentaci jádra, postupnou tvorbou apoptotických tělísek, které obsahují části cytoplasmy i fragmenty jádra. Tato tělíska jsou postupně fagocytována makrofágy a jinými fagocytujícími buňkami. Rozdíl vyplývá z obrázku č. 8:

Obrázek č. 8. Schéma apoptózy (Masopust 2003)



1.1.1.1. Metody stanovení parametrů biologické aktivity

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

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

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