

PREDIKTIVNI I PROGNOŠTIČKI ZNAČAJ MOLEKULARNIH MARKERA ZA KARCINOM KOLONA I REKTUMA

Ivan Stevanović

Tumorski markeri su molekuli koji se nalaze u krvi ili tkivima obolelih od malignih bolesti. Njihovo identifikovanje i kvantifikovanje može biti veoma bitan faktor u donošenju odluka koje se tiču postavljanja dijagnoze i/ili lečenja, odnosno, preoperativnog i postoperativnog praćenja bolesnika. Idealni marker bi trebalo da ima apsolutnu specifičnost i senzitivnost i da njegove vrednosti koreliraju sa stadijumom bolesti, kao i sa odgovorom pacijenta na primenjenu terapiju (1).

Tumorski markeri klasifikuju se u nekoliko kategorija: tumor-specifični antigeni, tumor-asocirani antigeni, produkti mutiranih onkogenih i tumor-supresorskih gena, produkti mutiranih ćelijskih gena pod uticajem zračenja i/ili hemijskih kancerogena, produkti virusnih onkogenih, onkofetalni onkogeni i izmenjeni glikolipidi i glikoproteini.

Metode koje se koriste za detekciju tumorskih markera obuhvataju imunohistohemiju, tehnike hibridizacije (FISH), PCR i ELISA tehnike (Slika 1)

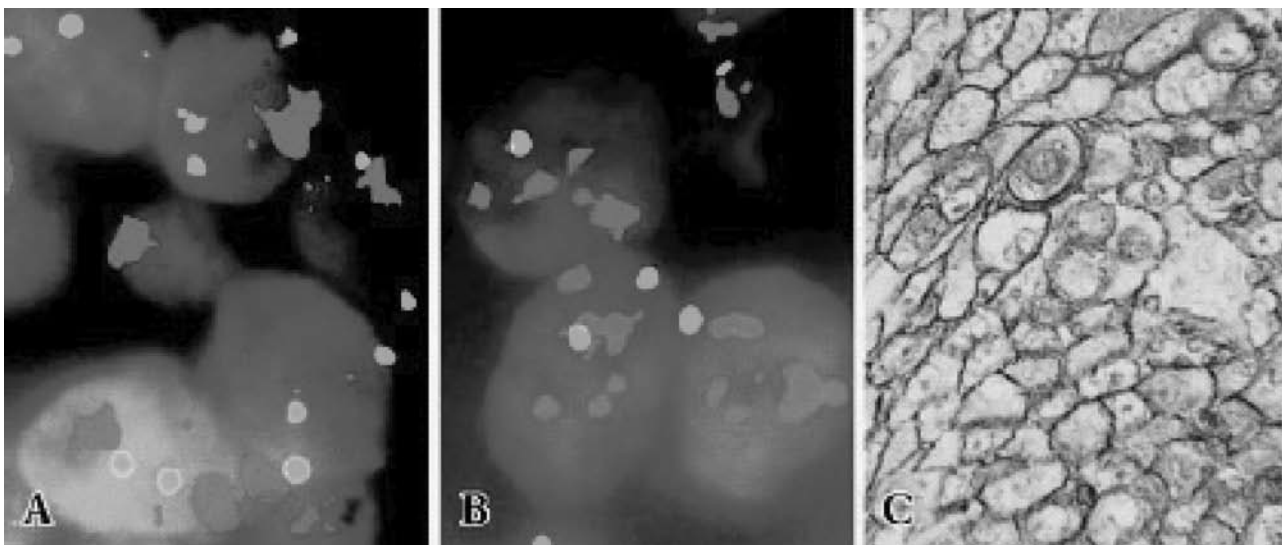
Prema do sada publikovanim istraživanjima za kolorektalni karcinom (engl. carcinoma colorectalis, CRC), postoji nekoliko više ili manje pouzdanih markera koji pružaju kvalitetne prognostičke ili prediktivne informacije: karcinoembriogeni antigen (CEA), karbohidratni kancer antigeni (CA 19-9), CA 50, CA 242, serumski gastrin, katepsin b, CD-44 variant 6, CD 26, kao i nivo ekspresije gena p16, p21 i p53.

Karcinoembriogeni CEA i karbohidratni antigen CA 19-9 su najčešće korišćeni tumor-asocirani markeri, koji se prate u terapijskom tretmanu pacijenata sa kolorektalnim karcinomom. Kovarijantnom analizom više različitih prognostičkih

faktora, kako klasičnih (starosno doba, pol, tumorska infiltracija i stadijum karcinoma), tako i novootkrivenih, kao što je nivo molekula CEA i/ili CA 19-9, zaključeno je da postoperativna, patohistološka Dukes-ova klasifikacija po značaju stoji rame uz rame sa preoperativnim nivoima CA 19-9 i CEA (2).

CEA je otkriven šezdesetih godina XX veka kod bolesnika sa adenokarcinomom kolona, koji je kompleksni glikoprotein koji pripada grupi onkofetalnih proteina, a nalazi se na površini ćelije i lako oslobađa u okolne tečnosti. Karakteristika CEA je jaka reaktivnost sa tumorskim ćelijama, znatno slabija sa zdravim ćelijama i jaka reaktivnost sa monoklonskim antitelima, tako se iz njihove koncentracije dobija indirektan uvid u ćelijsku proliferaciju i metastatski potencijal tumora. Povećane koncentracije CEA pokazane su i kod drugih tumora (pluća, dojka, želudac, pankreas), kao i kod benignih lezija (ciroza, pankreatitis, nespecifična zapaljenja debelog creva). Kod bolesnika koji su pre operacije imali povećane koncentracije CEA, vrednosti CEA se normalizuju tokom dve do tri sedmice posle operacije. Ukoliko su koncentracije CEA ostale povećane i posle tog vremena, one ukazuju na nedovoljnu radikalnost operacije, rezidualnu neoplazmu ili skrivene udaljene metastaze. Ponovno povećanje CEA u serumu, posle perioda normalizovanja, najčešće svedoči o pojavi recidiva bolesti (lokalni recidiv, metastaza u jetri ili plućima). Senzitivnost testiranja ovog molekula iznosi 60% (3).

Smatra se da pacijente kod kojih je koncentracija CEA veća od 15ng/ml treba smatrati visoko rizičnim u



Slika 1. A i B: FISH, C: Imunohistohemija

smislu recidiva, čak i kad se oni mogu klasifikovati u Dukes-ovu B grupu (4).

Povišena koncentracija CA 19-9 preoperativno može da posluži kao koristan marker u identifikaciji pacijenata sa kolorektalnim karcinomom bez limfonodalnih metastaza, a sa visokim rizikom od recidiva tumora posle hirurške intervencije (5). Određivanje molekula CA 19-9 ima nižu senzitivnost (od oko 30 do 50%) (2).

I pored nepoznate biološke funkcije CEA i CA 19-9 u CRC, kvantitativno određivanje ovih antigena u kolorektalnom tkivu predstavlja značajan prognostički marker, te pojedini istraživači zaključuju da preoperativne serumske vrednosti CEA i CA 19-9 treba pridružiti obavezanim procedurama u određivanju stadijuma bolesnika sa CRC (5), dok vrednosti ostalih tumorskih markera tek treba da budu evaluirane u budućim istraživanjima. Koncentracije CEA i CA 19-9 markera najčešće se određuju metodom imunoluminiscencije (normalni opseg prema referentnim vrednostima laboratorije, najčešće CEA do 3,3ng/ml za nepušače i do 9 ng/ml za pušače i za CA 19-9 od 0-33 U/ml) (6).

Pokazano je i da se kod pacijenata u stadijumu I-III, kod kojih je praćena koncentracija najmanje tri tumorska markera (CEA / CA 19-9 / p53) u serumu, i/ili koji su imali povećanu ekspresiju ovih markera na površini tumorskih ćelija, češće javljaju recidivi ili metastaze primarnog tumora. Zato se smatra da bi ova tri tumorska markera mogla predstavljati korisne prognostičke pokazatelje postoperativnog preživljavanja, posle uklanjanja tumora (7).

Izvestan prognostički značaj bi mogao imati i molekul CA 50, jer je zapaženo da može dati određenu predikciju preživljavanja (4).

Ispitivanje povezanosti serumske koncentracije CA 242 i preživljavanja pacijenata sa CRC je pokazalo da nivo ovog molekula ispod 20 U/l statistički značajno korelira sa produženim preživljavanjem u odnosu na pacijente sa povećanjem koncentracije istog molekula (8).

Koncentracije pojedinih tumorskih markera pokazuju različit profil u zavisnosti od lokalizacije CRC, pa su tako zapažene povećane koncentracije serumskog gastrina kod tumora u proksimalnom delu kolorektalnog segmenta, dok su kod distalnih karcinoma koncentracije gastrina bile niske, a molekula CA 19-9 i CEA značajno veće od normalnih (6).

Povećana koncentracija (iznad - 9,4ng/ml) serumskog enzima Catepsina B (Cat B) pokazana je ELIZA testom u serumu pacijenata sa kolorektalnim karcinomom, posebno onih sa lošijom prognozom

preživljavanja. Otkrivena je i korelacija visokih vrednosti ovog enzima sa odmaklim stadijumima po Dukes-u. Pacijenti sa visokim vrednostima CEA se na osnovu vrednosti Cat B enzima mogu klasifikovati u one sa visokim i one sa niskim rizikom od recidiva (9).

CD26 je ektoenzim sa dipeptidil-peptidaznom aktivnošću koji je prisutan na površini različitih tipova ćelija. Iako je funkcija visoke koncentracije solubilnog molekula CD26 u serumu nepoznata, sugerise se da je verovatno povezana sa klirensom biološki aktivnih polipeptida u serumu. Pošto je koncentracija CD26 molekula, ili njegove enzimske aktivnosti, povezana sa kolorektalnim karcinomom, ispitivana je i prognostička i prediktivna vrednost preoperativnog merenja aktivnosti ovog molekula ELISA testom. Pokazana je statistički značajna razlika u aktivnosti ovog enzima kod zdravih i obolelih od kolorektalnog karcinoma, i utvrđena granična vrednost od 410 µg (senzitivnost i specifičnost oko 90%). Zaključak je da je ovaj marker efikasniji od bilo kog drugog markera, posebno kod pacijenata u ranijim stadijumima bolesti. Od posebnog značaja je i podatak da ovaj parametar ne zavisi, odnosno nije usko povezan, sa ostalim prognostičkim i prediktivnim faktorima, kao što su: Dukes-ova klasifikacija, pol, starosno doba, lokalizacija tumora ili njegov stepen diferencijacije. Nepoznanica ostaje poreklo ovog molekularnog markera (10).

Rezistencija na hemoterapeutike predstavlja ključnu prepreku uspešnom tretmanu karcinoma (11). Prognostička informacija o osetljivosti malignih ćelija na hemioterapiju, kao i informacija o riziku od postoperativnog recidiva kolorektalnog karcinoma (definisana morfološkim, serološkim i molekularnim markerima) može imati posebnu vrednost, naročito za pacijente u II i III stadijumu po UICC-u, koji bi mogli imati veliku korist od adjuvantne hemioterapije (7). Tako, molekul CD 44 variant 6, koji ima brojne funkcije u interakciji ćelija, može biti determinišući faktor za invazivnu i metastatsku aktivnost CRC. Zato određivanje nivoa ekspresije ovog molekula na površini ćelija lokalno uznapredovalog ili metastatskog kolorektalnog karcinoma može omogućiti terapeutu da identifikuje pacijente koji će najbolje reagovati na hemoterapiju baziranu na leku Irinotekanu, ili kombinaciji Irinotekana, 5-fluorouracila i folne kiseline. Što je viši nivo ekspresije, bolji je terapijski odgovor. Nivo ekspresije ovog molekula se ispituje histoheмиjski odgovarajućim mikroskopom i softverom na parafinski obrađenim isečcima tumorskog tkiva (12).

Lokalni recidivi su posle operacije češći kod karcinoma rektuma, nego kod karcinoma kolona. Preoperativna radioterapija smanjuje stopu recidiva i povećava mogućnost preživljavanja kod pacijenata sa resektabilnim, uznapredovalim karcinomom rektuma.

Identifikacija prediktivnih faktora za radiosenzitivnost ovih tumora bila bi veoma korisna u donošenju odluke o tome koji bi pacijenti bili pogodni za preoperativno zračenje, odnosno koje pacijente nema potrebe izlagati preoperativnom tretmanu. Istraživanja su pokazala da se postiradijaciona ekspresija gena Ku, p53, p21 i p16 može uzeti kao pouzdan marker radiosenzitivnosti konkretnog tumora (13).

Trenutno, medicinska doktrina je da je CEA molekul najprecizniji tumorski marker za kolorektalni karcinom, te preoperativno ispitivanje njegove koncentracije kod pacijenta obolelog od kolorektalnog karcinoma pruža veliku pomoć u određivanju stadijuma tumora, planiranju terapijskog tretmana, kao i u postoperativnom praćenju. Postoperativno praćenje koncentracije CEA trebalo bi sprovoditi svaka tri meseca. Dalja klinička evaluacija lokalnog recidiva ili udaljenih metastaza morala bi biti sprovedena ukoliko se povećanje koncentracije CEA javi posle radikalne hirurške intervencije. Međutim, postojeći podaci ne opravdavaju stav da praćenje ovog tumorskog markera treba da bude jedini parametar za postoperativno praćenje pacijenata, odnosno ne treba donositi odluku o pogodnosti pacijenta za primenu adjuvantne terapije samo na osnovu tog parametra (14). Tokom vremena, sa novim saznanjima o ostalim tumorskim markerima CRC-a, najverovatnije će se rutinskom određivanju CEA pridružiti i određivanje drugih molekula, možda upravo onih klase CD26.

Molekularne genetske tehnike se sve više koriste za otkrivanje genskih alteracija koje bi mogle biti razmatrane kao prediktivni markeri (14). Na genskom nivou multivarijantne analize su pokazale da je mutacija K-ras gena povezana sa većim rizikom od vaskularne invazije i sledstvenih hematogenih metastaza CRC, dok se ispitivanje ekspresije p53 koristi za proučavanje mehanizama razvoja rezistencije ćelija malignih tumora na hemioterapeutike (15). Sugerise se da p53 - tumor supresorski gen ima veliki uticaj na osetljivost tumorskih ćelija na hemioterapiju, što je zasnovano na dvostrukoj ulozi ovog gena, kao čuvara integriteta genoma i kao ključnog medijatora procesa apoptoze.

Alteracija p53 gena javlja se kod približno 50% humanih tumora uključujući i CRC. Uticaj p53 je kompleksan, i u mnogome zavisi od genotipskog i/ili fenotipskog celularnog konteksta, pa brojne studije koje ispituju korelaciju p53 statusa i prognoze, odnosno terapijskog odgovora ćelija tumora ostaju sa kontraverznim rezultatima i zaključcima. Intencija daljih istraživanja je da se rasvetljavanjem uticaja mutacija ključnih ćelijskih gena, u koje spada i p53, unapredi efikasnost antikancerskih lekova kroz jasnu stratifikaciju pacijenata u odnosu na njihov očekivani terapijski odgovor (11).

Identifikacija i kvantifikacija nivoa ekspresije ovih gena u budućnosti možda će dati vredne informacije i o vulnerabilnosti zdravih osoba i mogućnosti nastanka kolorektalnog karcinoma kod njih u kasnijem životnom dobu (14).

ZAKLJUČAK

Identifikovanje i kvantifikacija tumorskih markera za kolorektalni karcinom postaje sve značajniji faktor u donošenju odluka vezanih za dijagnozu i terapiju ovog oboljenja, kao i za preoperativno i postoperativno praćenje toka maligne bolesti kod ovih pacijenata. U okviru tretmana kolorektalnog karcinoma prema važećoj medicinskoj doktrini rutinski se određuje samo nivo CEA, koji je prihvaćen kao najprecizniji tumorski marker za dijagnozu, određivanje terapijskog plana i praćenje toka bolesti, međutim ne sme se prenebregnuti potencijalni značaj novootkrivenih tumorskih markera. Tako se CA 50, CA 242, i Catepsin B određuju u smislu predviđanja preživljavanja pacijenata sa CRC, a CA 19-9 u cilju identifikacije pacijenata sa CRC bez limfonodalnih metastaza, koji su u visokom riziku od recidiva tumora nakon operacije, dok se ekspresija CD 44 variant 6 ispituje radi procene senzitivnosti malignog tkiva na hemioterapiju. Pokazano je i da nivo ekspresije gena p 53, p 21, p 16 i Ku može poslužiti kao koristan prediktivni faktor radiosenzitivnosti kolorektalnog karcinoma, a smatra se da će rutinsko određivanje nivoa CD 26 molekula najpre biti pridodato bateriji markera za kolorektalni karcinom, jer je otkriveno da taj tumorski marker CRC ima najveću senzitivnost i specifičnost, što je od posebnog značaja u ranim fazama bolesti.

LITERATURA

1. Bendardaf R, Lamlum H, Pyrhonen S. Prognostic and predictive molecular markers in colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2004;24(4):2519-30.
2. Reiter W, Stieber P, Reuter C, Nagel D, et al. Multivariate analysis of the prognostic value of CEA and CA 19-9 serum levels in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2000;20(6D):5195-8.
3. Yamamoto H, Miyake Y, Noura S, et al. Tumor markers for colorectal cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 2001;28(9):1299-305.
4. Forslund A, Engaras B, Lonnroth C, Lundholm K. Prediction of postoperative survival by preoperative serum concentrations of anti-p53 compared to CEA, CA 50, CA 242 and conventional blood tests in patients with colorectal carcinoma. *Oncology* 2004;66(2):126-31.

5. Nakagoe T, Sawai T, Tsuji T, et al. Preoperative serum level of CA19-9 predicts recurrence after curative surgery in node-negative colorectal cancer patients. *Hepatogastroenterology* 2003;50(51):696-9.
6. Bombski G, Gasiorowska A, Orszulak-Michalak D, et al. Differences in plasma gastrin, CEA, and CA 19-9 concentration in patients with proximal and distal colorectal cancer. *Int J Gastrointest Cancer* 2002;31(1-3):155-63.
7. Gasser M, Gerstlauer C, Grimm M, et al. Comparative analysis of predictive biomarkers for therapeutical strategies in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2007;14(4):1272-84.
9. Links Kos J, Nielsen HJ, Krasovec M, et al. Prognostic values of cathepsin B and carcinoembryonic antigen in sera of patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4(6):1511-6.
10. Cordero OJ, Ayude D, Nogueira M, et al. Preoperative serum CD26 levels: diagnostic efficiency and predictive value for colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000;83(9):1139-46.
11. Suxing Liu, W. Robert Bishop, Bimal Dasmahapatra, Yaolin Wang. Pharmacogenomics of the p53 tumor suppressor and its role in cancer chemoresistance. *Biological Research-Oncology*, Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, New Jersey.
12. Bendardaf R, Lamlum H, Ristamaki R, Pyrhonen S. CD44 variant 6 expression predicts response to treatment in advanced colorectal cancer. *Oncol Rep* 2004;11(1):41-5.
13. Komuro Y, Watanabe T, Tsurita G, et al. Evaluating the combination of molecular prognostic factors in tumor radiosensitivity in rectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2005;52(63):666-71.
14. Hunerbein M. The value of tumor markers in colorectal cancer. *Recent Results Cancer Res* 1998;146:48-55.
15. Tanaka M, Omura K, Watanabe Y, et al. Prognostic factors of colorectal cancer: K-ras mutation, overexpression of the p53 protein, and cell proliferative activity. *J Surg Oncol* 1994;57(1):57-64.