

256 Elektroanalytické stanovení obsahu metalothioneinu v krvi u pacientů s karcinomy hlavy a krku.

Horáková Z.^{1,*}, Tóthová E.¹, Salzman R.¹, Binková H.¹, Adam V.², Fabrik I.², Šmerdová P.¹, Kříčková J.¹

1) *Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, Fakultní nemocnice U sv. Anny v Brně*

2) *Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně*

*) *Korespondenční autor: zuzana.horakova@fnusa.cz*

Úvod

Metalothioneiny (MT) patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních, na cystein bohatých proteinů o molekulové hmotnosti 6-10 kDa. MT se skládá ze dvou vazebných domén α a β , které jsou složeny z cysteinových klastrů. Sulfhydrylové zbytky cysteinů se účastní kovalentní vazby atomů kovů. V případě jednomocných iontů kovů je MT schopen vázat celkem až 12 atomů. Lidské MT patří do I. třídy metalothioneinů a jsou kódovány rodinou genů tvořící 10 isoform. Vzniklé proteiny jsou rozděleny do čtyř skupin: MT-1, MT-2, MT-3 a MT-4. MT-1 a MT-2 jsou exprimovány v lidském organismu ubikvitně ve velmi nízkých koncentracích. K primárním rolím MT v organismu patří udržování homeostázy zinku, detoxikace těžkých kovů a ochrana před oxidativním stresem. Expres MT je indukovatelná mnoha exogenními a endogenními faktory jako jsou UV záření, těžké kovy, stresové hormony, volné kyslíkové radikály, mediátory zánětu, infekce, trauma nebo onkogeneze.

Recentní výzkumy podporují názor o roli MT v buněčné proliferaci a diferenciaci resp. v kancerogenezi. MT lze považovat za protein závislý na buněčném cyklu a za marker proliferace exprimovaný v S fázi buněčného cyklu. Tato teorie byla potvrzena imunohistochemickou verifikací zvýšené exprese MT u mnoha histologicky rozličných typů nádorů (prsů, tlustého střeva, ledvin, močového měchýře, plic, ovaria, prostaty, slinné žlázy, nosohltanu, hrtanu). Expres MT většinou korelovala s vysokou proliferací buněk, s agresivitou biologického chování nádorů, predikovala horší parametry přežití, souvisela s rezistencí na radio, resp. chemoterapii. Výsledky jednotlivých studií hodnotící míru exprese MT v nádorové tkáni i jeho vztah k histopatologickým parametřům a prognose onemocnění nejsou vzájemně konsistentní. Za negativní prognostický faktor může být považován na základě publikovaných výsledků například u ductálního karcinomu prsu, malobuněčného karcinomu plic nebo maligního melanomu. Naopak snížená expres byla popsána u hepatocelulárního karcinomu. Předpokládá se, že subcelulární lokalizace MT ovlivňuje jeho funkčnost; závisí na typu tumoru, růstové fázi, diferenciaci a apoptotickém indexu. V nenádorové tkáni dominuje cytoplasmatická lokalizace MT, v nádorové buňce naopak převažuje nukleární lokalizace MT.

Ačkoliv je MT protein převážně intracelulární, nízké koncentrace byly zjištěny také v extracelulárních tekutinách jako plasma, žluč, moč. K elevaci plasmatických koncentrací metalothioneinu dochází s rostoucím věkem, při expozici xenobiotikům, oxidativnímu stresu, u některých typů hepatopatií (primární biliární cirhosa, primární sklerotizující choangitis), akutního zánětu, autoimunních onemocnění.

Materiál a metodika

Klinický materiál

Zkoumaný soubor tvořili pacienti s maligními nádory hlavy a krku léčení na Klinice ORL a chirurgie hlavy a krku Fakultní nemocnice U svaté Anny v Brně v roce 2006. Podmínkou zařazení byla histologická verifikace dříve neléčeného maligního tumoru hlavy a krku. Vyloučeni byli pacienti s hematologickými malignitami, recidivami primárních tumorů a pacienti s duplicitami. Vzorky plné krve k analýze byly odebrány před zahájením terapie. V našem souboru bylo hodnoceno celkem 98 pacientů s verifikovanými karcinomy hlavy a krku, z nichž bylo 86 mužů a 12 žen, věkový průměr činil 62 let (medián 62±9; min 40, max 88).

Nejčastější lokalizací nádorů byl orofarynx (29), larynx (25), hypofarynx (13) a dutina ústní (12) ostatní lokalizace byly zastoupeny jen okrajově (dutina nosní a pnd -5, nasofarynx -1, slinné žlázy -3, metastázy do krčních uzlin neznámého prima -4, kožní nádory -5, parafaryngeální nádor -1).

Dle histologické klasifikace převažoval jednoznačně spinocelulární karcinom, v 89 případech. Ostatní histologické typy se vyskytovaly vyjimečně (adenokarcinom -3, velkobuněčný karcinom -1, drobnobuněčný karcinom -1, karcinom z acinárních buněk -1, bazocelulární karcinom -3).

Při rozdělení spinocelulárních karcinomů dle stupně diferenciaci jsme nejčastěji našli typ středně diferencovaný (33) dále níže diferencovaný (28), dobře diferencovaný (10) a nediferencovaný (5). U ostatních nebyla diferenciac stanovena.

Pokročilost onemocnění byla hodnocena dle mezinárodní TNM klasifikace. Bez ohledu na lokalitu byla většina nádorů diagnostikována až v pokročilém stadiu. (st IV- 59, st III- 19, st II- 8, st I- 8). Rovněž podle hodnot T převažovaly lokálně pokročilé nádory (T 4- 40, T 3- 23, T2-17, T 1-13). O relativně vysokém metastatickém potenciálu svědčí nádorové postižení krčních lymfatických uzlin téměř u 60% pacientů v době verifikace (N+ vs N0 : 59 vs 34). Vzdálené metastázy jsou u karcinomů hlavy a krku vzácné, vyskytly se pouze ve dvou případech.

Obecně lze říci, že v souladu s dostupnými literárními zdroji byly diagnostikovány laryngeální nádory v časnějším stadiu (T1+2 vs T3+4 : 9vs16; N 0 vs N+ : 15 vs 10; st I+II vs III+IV: 8 vs 17), narozdíl od karcinomů orofaryngu a dutiny ústní (T1+2 vs T3+4 : 13 vs 28; N 0 vs N+: 9 vs 32; st I+II vs III+IV: 3 vs 38) a zejména od karcinomů hypofaryngu (T1+2 vs T3+4: 3 vs 10; N 0 vs N+: 2 vs 11; st I+II vs III+IV: 1vs 12).

Příprava vzorků pro elektroanalytické stanovení metalothioneinu

Ze získaných vzorků plné krve bylo odebráno 100 μ l a umístěno na 15 min. při 99°C do termobloku (Eppendorf 5430, USA). Poté byly vzorky ochlazeny na 4°C a centrifugovány při 4°C, 15 000 g po dobu 30 min. (Eppendorf 5402, USA). Metalothioneiny patří k termostabilním proteinům, které zůstávají přítomné v roztoku i po jeho tepelné denaturaci. Takto připravené vzorky byly analyzovány námi upraveným postupem adsorptivní přenosové techniky (AdTS) s diferenční pulsní voltametrií (DPV) na přístroji AUTOLAB v klasickém třielektrodeovém uspořádání. AdTS DPV parametry byly následující: čas akumulace 120 s, počáteční potenciál -0,6 V, konečný potenciál -1,6 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 1,05 mV/s, modulační amplituda 250 mV, $E_{ads} = 0$ V, teplota 20°C. Množství analyzovaného vzorku bylo 5 μ l.

Výsledky

Při analýze naměřených hodnot MT nebyla v popsaném souboru nalezena souvislost mezi koncentracemi MT a věkem ani rozdíly mezi pohlavími (muži: n=86; průměr 8,76; medián 9,40 +4,79 ženy n=12; průměr 7,53; medián 8,28 \pm 5,02) p=0,37.

Výsledky byly statisticky hodnoceny a korelovány se standardními klinickými a histopatologickými parametry.

V závislosti na lokalitách nádoru nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v hladinách MT (larynx vs hypofarynx vs orofarynx vs cavum oris) p=0,95 (Kruskal–Wallis).

Vzhledem ke zcela jednoznačné převaze histologického typu spinocelulárního karcinomu nebylo možné provést validní srovnání s dalšími histologicky odlišnými malignitami.

Různé stupně diference, grading, spinocelulárních karcinomů se rovněž nelišily hodnotami MT (dobře vs středně vs níže vs nediferencovaný typ spinocelulárního karcinomu) p=0,95 (Kruskal–Wallis).

MT významně nesouvisel s pokročilostí nádorů v žádném ze srovnávaných parametrů, tj. s hodnotami T (T1+2 vs 3+4: p=0,89 Mann–Whitney; p=0,75 Kruskal–Wallis), N (N0 vs N+: p=0,98 Mann–Whitney; p=0,15 Kruskal–Wallis), ani stadiem (st I+II vs st III+IV: p=0,75 Mann–Whitney; p=0,77 Kruskal–Wallis).

lokality	n	T1+2	T3+4	I+II	III+IV	N0	N+	MT
larynx	25	9	16	8	17	15	10	9,91 \pm 4,83
hypofarynx	13	3	10	1	12	2	11	9,22 \pm 5,16
orofarynx	29	9	20	2	27	7	22	9,79 \pm 5,19
cavum oris	12	4	8	1	11	2	10	9,06 \pm 4,87

Tab. 1: rozdělení pacientů dle lokalizace nádoru

Závěr

Na základě dostupných literárních informací hraje ve složitém procesu karcinogeneze svou zatím neúplně objasněnou roli také MT. Imunohistochemicky byla na mnoha studiích potvrzena zvýšená exprese MT u různých typů nádorů. Často jeho hodnoty korelovaly s nízkým stupněm diference, pokročilostí nádorů, metastatickým šířením; tj. zvýšená exprese MT byla v těchto případech navržena za negativní prognostický faktor.

V popsaném souboru byly analogicky porovnávány hladiny MT v plné krvi se standardními, v praxi etablovanými, klinickými a patologicko-anatomickými parametry nádorů. Hypotézy a možné souvislosti mezi výše zmíněnými charakteristikami a MT se na našem souboru nepotvrdily. Koncentrace MT v krvi nekorelovala s TNM, stagingem ani gradingem nádorů. Nelišila se statisticky významně ani mezi jednotlivými lokalizacemi hlavy a krku.

Otázkou do budoucnosti zůstává možnost srovnání MT s parametry přežití (OAS a DFS) při dlouhodobějším sledování pacientů; tj. selekce pacientů s horší prognosou vyžadující rasantnější protinádorovou léčbu.