

# Nové a klinicky využívané onkomarkery karcinómu močového mechúra

## New and Clinically Used Oncomarkers of Bladder Cancer

Bilecová-Rabajdová M.<sup>1</sup>, Varga J.<sup>2</sup>, Urban P.<sup>1</sup>, Ostró A.<sup>2</sup>, Pilátová M.<sup>3</sup>, Mareková M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav lekárskej a klinickej biochémie a Labmed, a.s., LF UPJŠ Košice, Slovenská republika

<sup>2</sup> II. gynekologicko-pôrodná klinika, LF UPJŠ Košice, Slovenská republika

<sup>3</sup> Ústav farmakológie, LF UPJŠ Košice, Slovenská republika

### Súhrn

Karcinóm močového mechúra je štvrtým najčastejším nádorovým ochorením u mužov a ôsmym u žien. Onkomarkery zohrávajú dôležitú úlohu v skorej detekcii, ako aj monitorovaní terapeutického odpovede a prognóze daného ochorenia. Hľadanie nových markerov pomocou molekulovej analýzy stále pokračuje, pretože akékoľvek zvýšenie senzitivity a špecificity v diagnostike je veľkým prínosom v klinickej praxi.

### Kľúčové slová

karcinóm močového mechúra – markery – molekulárna diagnostika

### Summary

Bladder cancer is the fourth most common cancer in men and the eighth most common cancer in women. Oncomarkers play a crucial role in early detection of bladder cancer, as well as in treatment response monitoring and prognosis. Search for a new marker by molecular analysis is in progress because any diagnostic sensitivity and specificity enhancement is a great benefit for clinical practice.

### Key words

bladder cancer – tumor markers – molecular diagnostics

Táto práca bola realizovaná s podporou grantu VEGA 1/0102/10.

This study was supported by grant VEGA 1/0102/10.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



**RNDr. Miroslava Bilecová-Rabajdová**  
Ústav lekárskej a klinickej biochémie a Labmed, a.s.  
LF UPJŠ Košice  
Tr. SNP 1  
040 01 Košice  
Slovenská republika  
e-mail:  
miroslava.bilecova-rabajdova@upjs.sk

Obdrženo/Submitted: 22. 12. 2011

Přijato/Accepted: 12. 4. 2012

## Úvod

Karcinóm močového mechúra (CMM) predstavuje ochorenie postihujúce najmä vyššie vekové skupiny, s dominantnou incidenciou v 5.–7. dekáde života. Vzhľadom k rizikovým faktorom vzniku ochorenia je výskyt pred 40. rokom života zriedkavý [1] a je častejší u mužov ako u žien. K rizikovým faktorom CMM patrí fajčenie, expozícia chemickým kancerogénom (napr. 4-aminobifenyl, anilínové farbivá, benzidín, 2-naftylamín), vysoký prívod sodíka a tukov v potrave, cyklofosamid a iradiácia močového mechúra. Nádory močového mechúra zaujímajú, hneď za karcinómom prostaty, druhé miesto vo výskyte zhubných nádorov urogenitálneho traktu. Histologicky sú to najmä karcinómy z prechodného epitelu (urotelu – 98 %), zriedkavé sú adenokarcinómy, epidermoidné a zmiešané karcinómy. Multifokálny výskyt je prítomný v 25 % prípadov, pričom v 80 % prípadov s povrchovým CMM vzniká recidíva na inom ako pôvodnom mieste. Pri metastatickej chorobe je prítomná lymfogénna propagácia s metastázami v lymfatických uzlinách a/alebo hematogénna diseminácia s infiltráciou vzdialených orgánov. Približne 75–85 % CMM je v čase diagnózy zachytených vo včasnom štádiu povrchového nádoru, zvyšok predstavujú lokoregionálne pokročilé a metastatické nálezy. Dyzurické ťažkosti, hematuria, polakizúria spôsobujúca cystitídu, prostatitídu a následné bolesti v panvovej a lumbálnej oblasti sú prejavmi lokálne pokročilého CMM najčastejšie laterálnej, ale aj zadnej steny močového mechúra [2,3].

Štandardom diagnostiky CMM je cystoskopia s odberom biopsie na histopatologické vyšetrenie. Transabdominálna ultrasonografia je schopná odhaliť nádory, ktoré rastú exofyticky do lúmenu močového mechúra, nemožno však spoľahlivo zachytiť malé nádory a nádory, ktoré rastú primárne invazívne v stene močového mechúra. Cytologické vyšetrenie moču a vyšetrenie nádorových markerov z moču sa obzvlášť osvedčuje u nádorov s vyšším stupňom diferenciácie. Negatívne cytologické vyšetrenie ale nevylučuje prítomnosť nádoru, čo platí najmä pre nádory s nižším stupňom di-

ferenciácie. Cytologické vyšetrenie môže byť tiež zaťažené sťaženou interpretáciou výsledkov, v dôsledku prítomnosti infekcie, degeneratívnych zmien a pod. CT panvy a abdominálnej oblasti sa využíva najmä na stanovenie pokročilosti nádoru a infiltrácie regionálnych lymfatických uzlín. Sú to najpresnejšie dostupné vyšetrenia, hoci ich senzitivita je iba okolo 70 %. Táto skutočnosť viedla k výskumu a vývoju viacerých molekulových markerov CMM [4]. Niketóre štúdie popisujú detekciu molekulových markerov až s 76% validitou testu, najmä pri karcinómoch močového mechúra s exfoliáciou uroepitelu [5,6].

## Klinicky využívané onkomarkery

V súčasnosti, okrem už klinicky využívaných sérových nádorových markerov, pozorujeme aj výskum možnosti využitia nových molekulových, ako aj vývoj nových potenciálnych biomarkerov ako prognosticko-prediktívnych ukazovateľov karcinómu močového mechúra [6,7]. Z nádorových markerov sa v klinickej diagnostike využíva karcinoembryonálny antigén (CEA) a tkanivový polypeptidový špecifický antigén (TPS) (referenčná hodnota 189 U/l, citlivosť 50 %). Vyšetrovanie onkomarkerov sa využíva najmä na systematické sledovanie pacientov (v 2–3-mesačných intervaloch) s cieľom odhaliť progresiu ochorenia [8,9].

## CEA – karcinoembryonálny antigén

CEA je člen intracelulárnych adhezívnych molekúl, lokalizovaný v bunkových membránach epiteliálnych buniek, predovšetkým čreva. Pôsobí ako repulzná molekula zabráňujúca medzibunkovému kontaktu. Expresia týchto molekúl na povrchu nádorových buniek uľahčuje ich migráciu a motilitu – vznik metastáz [9,10]. CEA, ako súčasť imunoglobulínovej génovej rodiny, onkofetálnych glykoproteínov s vysokým obsahom sacharidov, je za fyziologických podmienok produkovaný vo vyvíjajúcom sa embryu, v dospelom veku epiteliálnymi bunkami črevnej sliznice, žalúdka a bronchov o koncentrácií 5 µg/l s citlivosťou 33,3 %. Avšak so znižujúcou sa diferenciáciou a rastúcou invazivitou sa schopnosť produkcie CEA

vytráca. Zvýšená hladina CEA bola detegovaná pri CMM, karcinóme ovárií, ale aj pri benígnych afekciách napr. mamopatiách, cirhóze pečene, ulceróznej kolitíde a pľúcnom emfyzéme. V súčasnosti možno jednoznačne konštatovať nízku špecifitu CEA markeru, nedostatočnú k využitiu u onkologického screeningu, avšak môže byť dostatočným prognostickým ukazovateľom [11,12].

## Fragmenty cytokeratínu

CYFRA 21-1 predstavuje fragmenty cytokeratínu 19, ktoré sa dostávajú do krvného riečišťa pri proliferácii a deštrukcii buniek (aktiváciou proteolytických enzýmov), nakoľko cytokeratín 19 je súčasťou intermediárnych filamentov epiteliálnych buniek. Monitoruje nemalobunkové karcinómy pľúc, CMM a karcinómy prsníka. V klinickej praxi je možné využitie TPS antigénu a CYFRA 21-1 pri sledovaní účinnosti terapie. TPS je M3 determinantom cytokeratínu 18 a je nešpecifickým ukazovateľom zmien proliferácie u nádorov epiteliálneho pôvodu, najmä karcinómov mliečnej žľazy, CMM, ako aj rôznych nediferencovaných a málo diferencovaných foriem nádorov. Pri relapsoch CMM, najmä pri korelácii cytologických výsledkov, sa využíva kvantitatívna detekcia ľudského faktora komplementu H-related proteínu (BTA TRAK) a močové fragmenty cytokeratínov 8 a 18 (UBC IRMA). Avšak kvantitatívne BTA a UBC testy majú nízku senzitivitu v detekcii recidívy CMM, a teda nemôžu byť bežne použité k zníženiu počtu cystoskopií počas observácie pacienta.

## NMP22 – jadrový matrixový proteín 22

Klinicky sa využíva test na prítomnosť NMP22, ktorý pozostáva z aplikácie pár kvapiek moču na testovací „papierik“, na ktorom v prípade prítomnosti NMP22 dochádza k farebnej zmene. NMPP je tzv. jadrový matrixový proteín 22, ktorý sa v nádorových bunkách močového mechúra vyskytuje v 20- až 80-násobne vyššej koncentrácii ako v normálnych bunkách. Metóda odhalila asi 3-krát viac včasných štádií CMM ako už spomínaná cytológia sedimentu a 2-krát viac pokročilých tumorov.

### Nové, potenciálne možné onkomarkery

Ďalším možným diagnostickým prístupom je detekcia špeciálnych markerov na úrovni génov alebo proteínov. Početné štúdie potvrdili úzky vzťah medzi angiogenézou a tvorbou metastáz. V prípade nádorového bujnenia môže byť neoangiogenéza spustená poruchou rovnováhy medzi angiogennými aktivátormi a inhibítormi. Typickými aktivátormi angiogenézy sú hypoxia, hypoglykémia a faktory ako angiogénin, angiopoetín 1 a 2, FGF (fibroblastový rastový faktor), PDGF (platelet derived growth factor), TGF- $\alpha$  (transforming growth factor alfa), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor alfa), VEGF (vaskulárny endoteliálny rastový faktor) a ich receptory. Proces angiogenézy na druhej strane blokujú inhibítory, ako napr. angiostatín a endostatín. Existuje veľké množstvo prác popisujúcich zmeny exprese génov zapájajúcich sa do procesov angiogenézy (FGF, VEGF), proliferácie (cytokeratín 20) či apoptózy (p53) [13]. Doposiaľ však nie všetky výsledky štúdií sú potvrdené s klinickou významnosťou a využívané pri diagnostike uroteliálnych karcinómov.

### OPG – glykoproteín osteoprotegerín

Jedným z pro-angiogenných faktorov je OPG, ktorý je členom skupiny tumor nekrotizačných faktorov (TNF). OPG inhibuje osteoklastogenézu cez naviazanie sa na TRAIL (apoptózu indukujúci ligand súvisiaci s TNF). Bola popísaná zvýšená expresia génu OPG v tkanivách karcinómov v porovnaní s tkanivami zdravých jedincov. OPG môže zvyšovať prežívanie endoteliálnych buniek, proliferáciu a migráciu [14,15]. Mizutani et al [14] popisujú koreláciu medzi hladinou OPG v sére, progresiou a štádiom CMM. Sledovanie hladín tohto proteínu využitím ELISA testu je jednou z možností detekcie malignít urogenitálneho traktu.

### PKG – proteínkináza závislá na cGMP

Možnými vaskulárnymi markermi pre detekciu včasných uroteliálnych karcinómov sú aj PKG a neuropilín1 (NRP1). PKG sa zúčastňuje viacerých dôležitých regulačných procesov v mnohých ty-

poch buniek [10]. Táto proteínkináza vykazuje silné antiproliferatívne a apoptotické účinky. U cicavcov sú známe tri izoformy PKG:  $\alpha$  a  $\beta$  izoformy typu 1 vnikajú alternatívnym zostrohom mRNA takmer vo všetkých tkanivách, na rozdiel od typu 2, ktorého expresia je obmedzená na určité druhy buniek, napr. kardiomyocyty, mezangiálne bunky a neutrofile [16,17]. Doteraz neboli publikované štúdie o regulácii exprese PKG. Nedávno bolo potvrdené zníženie hladiny PKG v nádorových bunkách v porovnaní s normálnym tkanivom. Predpokladá sa, že PKG účinkuje inhibične na  $\beta$ -katenín, čo umožňuje VEGF zahájiť intenzívnu angiogenézu abnormálne proliferujúcim nádorovým bunkám [18]. Vzhľadom k vyššie popísaným faktom je možné predpokladať koreláciu medzi zníženou expresiou PKG a progresiou karcinómu.

### NRP – neuropilín

Oproti PKG, neuropilín (NRP) priamo zasahuje do regulácie aktivity VEGF. NRP sú multifunkčné kinázové receptory, ktoré viažu viaceré izoformy VEGF [19]. Viaceré práce naznačujú, že NRP sú exprimované v endoteli ciev nádorov, kde v priebehu karcinogenézy dochádza k niekoľkonásobnému vzrastu ich exprese [19,20]. Z uvedeného je možné predpokladať, že hladina mRNA a proteínu NRP1 koreluje s progresiou nádoru a prognózou pacienta.

### MMPs – matrixové metaloproteinázy

Hlavná funkcia MMPs, patriacich do rodiny zinok-dependentných endopeptidáz, je degradácia proteínov extracelulárnej matrix, stimulačný vplyv na proliferáciu, diferenciáciu, angiogenézu a migráciu nádorových buniek. Pomocou tkanivových inhibítorov metaloproteináz (TIMPs – tissue inhibitors of metalloproteinases) dochádza k regulácii MMPs. Sérové hladiny analytov MMPs a TIMPs detegujeme pri mnohých typoch uroteliálnych, avšak aj gynekologických, karcinómoch [21]. Najnovšie štúdie stanovenia katecholamínov naznačujú, že katecholamíny môžu potenciálne zvyšovať schopnosť invázie, keďže noradrenalin ovplyvňuje pohyblivosť nádorových buniek a cirkulujúce

katecholamíny ovplyvňujú expresiu metaloproteináz v matrixe tkaniva a tie napomáhajú invázii tumorových buniek. Stimulácia nádorových buniek katecholamínmi môže viesť k zvýšeniu VEGF, proangiogeného faktora, ktorý je mediátorom šírenia nádorov v krvnom riečišti [22].

### Záver

Molekulová analýza prináša prostredníctvom diagnostiky na génovej úrovni komplexný pohľad na vzájomne vzťahy medzi úrovňou génovej exprese a zvýšeným či zníženým množstvom konkrétnych proteínov v bunkách, v závislosti na fyziologickom, patologickom stave. Akýkoľvek onkomarker, ktorý zvýši diagnostickú senzitivitu či špecificitu, je veľkým prínosom v klinickej praxi, keďže môže poskytnúť možnosť na včasnú diagnostickú a terapeutickú intervenciu, a následnú lepšiu prognózu pre pacienta.

### Literatúra

1. Litwack G. Human biochemistry and disease. Stratford: Academic press Elsevier 2008: 570–573.
2. Kindlová E, Kovařík J, Kubecová M et al. Orgán záchovný postup v liečbe invazívneho karcinomu močového mechúra. Vybrané otázky onkologie VI. Praha: Galén 2002: 36–39.
3. Kwon IK, Schoenlein PV, Delk J et al. Expression of cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in metastatic colon carcinoma cells blocks tumor angiogenesis. Cancer 2008; 112(7): 1462–1470.
4. Pallis AG, Fennell DA, Szutowicz E et al. Biomarkers of clinical benefit for anti-epidermal growth factor receptor agents in patients with non-small-cell lung cancer. Br J Cancer 2011; 105(1): 1–8.
5. Rosser CJ, Liu L, Sun Y et al. Bladder cancer-associated gene expression signatures identified by profiling of exfoliated urothelia. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009; 18(2): 444–453.
6. Bartels CL, Tsongalis GJ. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. Clin Chem 2009; 55(4): 623–631.
7. Hahn WC, Weinberg RA. Modelling the molecular circuitry of cancer. Nat Rev Cancer 2002; 2(5): 331–341.
8. Stenvang J, Silahatoglu AN, Lindow M et al. The utility of LNA in microRNA-based cancer diagnostics and therapeutics. Semin Cancer Biol 2008; 18(2): 89–102.
9. Soker S, Takashima S, Miao HQ et al. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. Cell 1998; 92(6): 735–745.
10. Shahzad MM, Arevalo JM, Armaiz-Pena GN et al. Stress effects on FosB- and interleukin-8 (IL8)-driven ovarian cancer growth and metastasis. J Biol Chem 2010; 285(46): 35462–35470.
11. Abogunrin F, O'Kane HF, Ruddock MW et al. The impact of biomarkers in multivariate algorithms for bladder cancer diagnosis in patients with hematuria. Cancer 2012; 118(10): 2641–2650.

12. Hegele A, Mecklenburg V, Varga Z et al. CA19.9 and CEA in transitional cell carcinoma of the bladder: serological and immunohistochemical findings. *Anticancer Res* 2010; 30(12): 5195–5200.
13. Kundal VK, Pandith AA, Hamid A et al. Role of NMP22 Bladder Check Test in early detection of bladder cancer with recurrence. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010; 11(5): 1279–1282.
14. Mizutani Y, Matsubara H, Yamamoto K et al. Prognostic significance of serum osteoprotegerin levels in patients with bladder carcinoma. *Cancer* 2004; 101(8): 1794–1802.
15. Benchor R, Grewal S. Therapeutic targets of the TNF superfamily. New York: Springer 2009: 186–195.
16. Reid PE, Brown NJ, Holen I. Breast cancer cells stimulate osteoprotegerin (OPG) production by endothelial cells through direct cell contact. *Mol Cancer* 2009; 8: 49.
17. Kwon IK, Thangaraju M, Shuang H et al. PKG inhibits TCF signaling in colon cancer cells by blocking  $\beta$ -catenin expression and activating FOXO4. *Oncogene* 2010; 29(23): 3423–3434.
18. Seaman S, Stevens J, Yang MY. Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis. *Cancer Cell* 2007; 11(6): 539–554.
19. Stephenson JM, Banerjee S, Saxena NK et al. Neuropilin-1 is differentially expressed in myoepithelial cells and vascular smooth muscle cells in preneoplastic and neoplastic human breast: a possible marker for the progression of breast cancer. *Int J Cancer* 2002; 101(5): 409–414.
20. Oliveira PA, Colaço A, Chaves R et al. Chemical carcinogenesis. Biomedical and medical sciences. *An Acad Bras Cienc* 2007; 79(4): 3761–3765.
21. Vasala K, Kuvaja P, Turpeenniemi-Hujanen T. Low circulating levels of ProMMP-2 are associated with adverse prognosis in bladder cancer. *Tumour Biol* 2008; 29(5): 279–286.
22. Shinkaruk S, Bayle M, Lähn G et al. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003; 3(2): 95–117.