

TUMORSKI MARKERI: BIOHEMIJA I KLASIFIKACIJA

Nada Majkić-Singh

Institut za medicinsku biohemiju, Farmaceutski fakultet i Klinički centar Srbije, Beograd

Kratak sadržaj: Tumorski marker je supstanca koja se nalazi u tumoru, ili je on sam stvara, ili sam domaćin kao odgovor na tumor, a koristi se za razlikovanje tumora od normalnog tkiva ili da se utvrdi prisustvo tumora na osnovu merenja u krvi ili u drugim telesnim tečnostima. Takva supstanca se nalazi u ćelijama, tkivima ili telesnim tečnostima. Meri se kvalitativno ili kvantitativno hemijski, imunološki, genomskim ili proteomskim metodama radi utvrđivanja prisustva karcinoma. Tumorski markeri su biohemijski ili imunološki pokazatelji za razlikovanje stadijuma tumora. Brojni tumorski markeri odražavaju supstance koje se normalno embriološki stvaraju u odgovarajućim tkivima. Prvi zabeleženi tumorski marker je bio *Bence-Jonesov* protein. Mnogo godina posle ovog otkrića, identifikovani su brojni hormoni, enzimi, izoenzimi i drugi proteini, čija se koncentracija u telesnim tečnostima menja usled malignog procesa. Nove tehnologije kao što su mikroarej, masena spektrometrija, veštačka inteligencija i druga bioinformatička sredstva još uvek su u povelju svog razvoja. Međutim, ove tehnologije će svakako omogućiti razvoj novih biomarkera kao tumorskih markera. U ovom radu opisani su razvoj, biohemija i funkcionalne karakteristike malignog procesa, kao i klasifikacija poznatih tumorskih markera.

Cljučne reči: tumorski markeri, maligni proces, razvoj, biohemija, funkcionalne karakteristike, klasifikacija

Otkrivanje i primena tumorskih markera

Poslednjih 20 godina naučna otkrića u oblasti biomedicine su neočekivano napredovala, pa i u oblasti različitih biomarkera za otkrivanje i praćenje malignih procesa. Tumorski markeri bi trebali da daju odgovor na niz pitanja, kao što su: da li pacijent ima karcinom; ako ima koji organ je zahvaćen; da li je karcinom lokalizovan ili diseminovan; koliko je karcinom agresivan; da li će pacijent reagovati na terapiju i sl. Da bi se dobili odgovori na sva ova pitanja u budućnosti će se morati istrajati na iznalaženju novih mnogo osetljivijih biomarkera.

Bence-Jones je 1846. godine opisao taloženje proteina u zakišljenom urinu u pacijentat s multiplim mijelomom. Ovaj monoklonski imunoglobulin lakog lanca prvi je identifikovani marker karcinoma i klinički se koristi do današnjih dana. Mnogo godina posle *Bence-Jonesovog* otkrića u periodu između 1928. i 1963. godine otkriveni su brojni hormoni, enzimi, izoenzimi i drugi proteini čija se koncentracija menja u telesnim tečnostima usled malignog procesa (1). Tako je npr. kisela fosfataza korišćena kao marker karcinoma prostate od 1930. do 1990. godine. Godine 1963. odnosno 1965. otkrivena su dva tumorska markera i to alfa-fetoprotein, AFP (za hepatom) i kar-

cinoembrioni antigen, CEA (za kolorektalni karcinom), koji se intenzivno koriste i danas.

Nobelova nagrada dodeljena je 1960. godine za otkriće radioimunoodređivanja koje je omogućilo specifično i osetljivo određivanje malih količina supstanci u biološkim tečnostima, kao i 1975. godine za primenu monoklonskih antitela. Ova tehnologija omogućila je otkriće brojnih novih tumorskih markera, uključujući ugljenohidratne antigene CA125, CA 15.3, CA 19.9. Godine 1980. otkriven je prostatačni specifični antigen (PSA), kao jedan od najboljih markera karcinoma (*Tabela 1*) (2).

Takođe u periodu između 1970. i 1980. godine uvode se novi koncepti – onkogeni i tumorskih supresornih gena. Osim toga, rekombinantna DNK tehnologija, PCR (polymerase chain reaction), automatsko sekvenciranje i druge molekularne tehnike omogućile su jednostavno analiziranje DNK i mRNK u oblasti molekularnog dijagnostikovanja karcinoma.

Danas je poznato na stotine tumorskih markera koji mogu imati prognostički i prediktivni značaj. Međutim, osim u slučaju nekoliko izuzetaka, oni za kliničare nemaju veliki značaj. Naime, tumorski markeri su veoma značajni za praćenje efikasnosti terapi-

Tabela I Istorijski pregled otkrivanja tumorskih biomarkera

1846	Bence-Jones protein
1940	Kisela fosfataza
1960	Imunoodređivanje
1963	Alfa-fetoprotein (AFP)
1965	Karcinoembrioni antigen (CEA)
1975	Monoklonska antitela
1980	CA 125, PSA, ugljenohidratni antigeni
1970–1980	Onkogeni i tumorski supresorni geni
2001	Mikroarej, masena spektrometrija, neuralna mreža, multiparameterska analiza, bioinformatika

je, kao i za predviđanje odgovora na terapiju. Primena tumorskih markera je ograničena u oblasti skrininga, dijagnostikovanja, procenjivanja prognoze, utvrđivanja stupnja i lokalizacije tumora. To znači da je većina tumorskih markera prvenstveno značajna za praćenje terapije, a da je samo nekoliko njih korisno za rano otkrivanje karcinoma (Tabela II). Čak i prostatični specifični antigen (PSA), koji je najkorisniji tumorski marker ima ograničenu primenu zbog nespecifičnog povišenja usled benigne prostatične hiperplazije (BPH). Skoro niti jedan tumorski marker nije značajan u prevenciji oboljenja. Međutim, znanja iz genomike, proteomike i bioinformatike omogućiće u budućnosti razvoj mnogo snažnijih dijagnostičkih sredstava (3).

Tabela II Sadašnja primena tumorskih markera i ograničenja

Primena	Sadašnja korisnost	Napomena
Skrining karcinoma	Ograničena	Za skrining marker mora da se povećava u ranoj fazi bolesti; većina tumorskih markera povećava se u kasnijem stadijumu bolesti (izuzev PSA); niska dijagnostička osetljivost. Sa izuzetkom PSA većina tumorskih markera nije specifična za određeno tkivo; povećavaju se usled benignih ili inflamatornih oboljenja.
Dijagnostikovanje karcinoma	Ograničeno	Niska dijagnostička osetljivost i specifičnost; pomoć kliničaru za indikovanje drugih tehnika (radioloških ili laparaskopskih).
Procena prognoze	Ograničena	Većina tumorskih markera ima prognostičku vrednost, mada njihova tačnost nije dovoljno dobra da bi garantovala terapijsku intervenciju.
Procena terapijskog odgovora	Značajna	Bez obzira na značaj primene biomarkera u predviđanju odgovora na specifičnu terapiju, mali broj poznatih markera ima takav prediktivni značaj (npr. receptori steroidnih hormona kojima se predviđa odgovor na anti-estrogene i Her-2/neu amplifikaciju pri predviđanju odgovora na Herceptin kod pacijenata sa karcinomom dojke).
Gradiranje tumora	Ograničeno	Nedovoljno tačni za utvrđivanje gradusa tumora.
Otkrivanje ponovne pojave ili remisije	Kontraverzno	Nedovoljna specifičnost
Lokalizacija tumora i primena radio-terapeutskih agenasa	Ograničena	Samo nekoliko biomarkera se koristi za ovu primenu; sa ograničenim uspehom.
Praćenje efektivnosti terapije karcinoma	Značajno	Kod uznapredovalih stanja mogu biti korisni za procenu uspešnosti terapije.

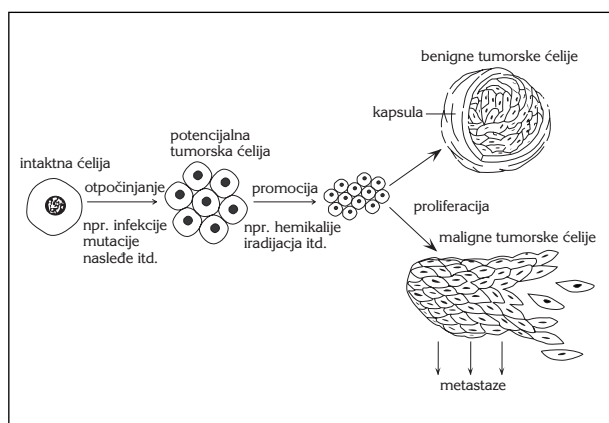
Pretpostavlja se da će nova znanja u pogledu sekvence humanog genoma, otkrivanje svih gena, svih proteina u rekombinovanom obliku, celularne lokalizacije svih proteina, funkcije proteina, proteinske strukture na 3-dimenzionalnom nivou, biohemijskih puteva, definisanih reagenasa za proteine, odgovarajućih antitela, svih pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama humanih gena, mutacionih karcinoma (somatskih i naslednih), bioinformatike i veštačke neuralne mreže, omogućiti i bolje razumevanje nastanka i izlečenja karcinoma (4, 5).

Nastanak tumora

Smatra se da je rak bolest dvadesetog veka. U ekonomski visoko razvijenim zemljama, maligni tumori zauzimaju drugo mesto u strukturi mortaliteta, odmah posle kardiovaskularnih bolesti. Učestalost malignih tumora varira u širokim granicama u zavisnosti od genetskog nasleđa, životne dobi, pola, mesta nastanka i različitih faktora okoline. U zemljama sa visokim ekonomskim standardom, svaki peti čovek umire od raka, pri čemu se više od jedne trećine malignih tumora leči.

Osim fizioloških promena, u ćeliji se mogu javiti i maligne promene koje se odlikuju između ostalog, brzim nekontrolisanim rastom ćelije. Pod ovakvim uslovima javljaju se nove supstance ili se povećava koncentracija već postojećih. Jedinjenja koja tumori stvaraju nazivaju se »tumorski markeri« i njihove povećane koncentracije u serumu ukazuju na maligne promene u organizmu.

Na slici 1. prikazano je nastajanje tumorskih ćelija iz normalne diferencirane ćelije pod dejstvom različitih faktora, kad dolazi do nekontrolisane diferencijacije i rasta ćelija. Mada su poznate razlike između malignih i normalnih ćelija, još uvek nisu poznati biološki razlozi usled kojih dolazi do kanceroznih promena. Smatra se da istovremeno deluje više faktora, kao što su hemijske i fizičke nokse, defekti u imunom sistemu i genetski faktori. Veoma često se javljaju pojedinačne degenerisane ćelije u organizmu, međutim,



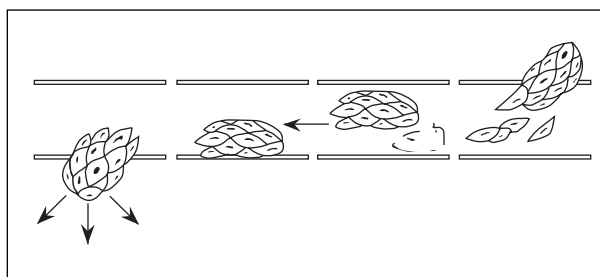
Slika 1 Tri faze razvoja tumorskih ćelija

one bivaju prepoznate i uništene pomoću intaktnog imunog sistema. Posle kardiovaskularnih oboljenja, maligna oboljenja su najčešći uzrok smrti, a procenat smrtnosti se kod ove vrste oboljenja povećava iz dana u dan.

Kao što se na slici 1. vidi usled ponovljenog deljenja ćelije, grupa ćelija se razmnožava u tumor (lat. tumor = tumor, guka, oteklina) koji može da bude benigni ili maligni. Benigni tumor je sličan zdravom tkivu, raste sporo s normalnom podelom ćelijskih jedara. Ovi tumori su okruženi kapsulom vezivnih tkiva i ne dovode do pojave metastaza (do rasejavanja, premeštanja). Za razliku od benignih tumora, maligni tumori rastu veoma brzo i ireverzibilno. Razlikuju se od okolnih tkiva, ćelije su nediferencirane, i rastu u okolnim tkivima s obzirom da nisu okružene kapsulom vezivnih tkiva. Prema tome pokazuju destruktivan rast i infiltriraju se u tkiva koja ih okružuju.

Pojedinačne ćelije mogu da se odvoje, da putuju u organizmu i dovode do pojave metastaziranja na mestima koja su udaljena od primarnog tumora (Slika 2). Pri tom najveći broj ćelija umire. Međutim, tumorske ćelije mogu da se vežu za zidove krvnih sudova i da rastu u okolnim tkivima i to naročito u onima kroz koja pojačano protiče krv (npr. pluća, jetra). Benigni i maligni tumori se razlikuju i po histološkoj slici, koja je kod benignih tumora tipična i diferencirana, a kod malignih tumora atipična i polimorfna.

Maligni tumor nastaje kao posledica aktivacije neoplastičnog programa ćelije ili gena koji omogućavaju autonomni rast, proliferaciju, invazivnost i pojavu metastaza. U genezi maligne neoplazme inicijalni momenat je lezija neke od vitalnih struktura ili funkcija ćelije posle čega kao odgovor sledi ekspresija neoplastičnog tkiva. Maligna alteracija ima karakter evolutivnog procesa u toku koga se vrši kontinuirana selekcija ćelijskih klonova s malignim fenotipom. Prema savremenim shvatanjima, maligna ćelija ne poseduje ništa što se ne može sresti kod zdrave normalne ćelije. Specifična je samo neprestana promena ekspresije gena i reprogramiranje sinteze proteina čiji je rezultat beskonačna heterogenost fenotipa neoplazme, što se odvija u funkciji autonomnog rasta, proliferacije i invazivnosti.



Slika 2 Način metastaziranja malignih tumora odvajanjem i prenošenjem pojedinačnih ćelija putem krvi i limfnih sudova

Sve supstance koje proizvodi sam tumor ili bilo kakvi proizvodi metaboličkog procesa udruženog s tumorom u organizmu, nazivaju se *tumorskim markerima*. To su supstance nastale u ćelijama tumora koje se izlučuju u različitim telesnim tečnostima i mogu se kvantitativno odrediti primenom različitih neinvazivnih biohemijskih metoda.

Primena tumorskih markera u kliničkoj onkologiji datira s' kraja šezdesetih godina ovoga veka. Danas je u primeni mnoštvo različito osetljivih i specifičnih tumorskih markera koji su u direktnoj vezi s jednom ili više histološki različitih vrsta neoplazmi. Njihova primena može biti korisna u ranoj dijagnostici malignih tumora u pretkliničkom stadijumu, praćenju evolucije prekanceroznih lezija i malignog procesa, otkrivanju recidiva kao i u prognozi toka bolesti (6, 7).

Biohemijske i funkcionalne karakteristike malignog procesa

Onkogeni i tumorski supresorni geni

U organizmu se za vreme života deli veliki broj ćelija (10^{16}), pri čemu se tokom deoba događaju i greške, odnosno mutacije. Veliki broj malignih neoplazmi razvija se upravo iz mutirajućih klonova ćelija i većina humanih neoplazmi je monoklalnog porekla. Jedna spontana mutacija nije dovoljna za nastanak malignog tumora, već je neophodan veći broj mutacija u istoj »liniji« ćelija. Da bi obezbedile opstanak u organizmu, maligne ćelije moraju posedovati izvesne prednosti u odnosu na zdrave ćelije do kojih dolaze prikupljanjem genetskih promena nastalih serijom uzastopnih mutacija.

Značajan prostor na putu rešenja misterije maligne alteracije ćelije predstavlja pronalazak onkogena, grupe koju čini 50 od ukupno 50 000 gena koje sadrži genom čoveka. Prvi identifikovani onkogen bio je »src-onkogen« Rousovog virusa sarkoma pilića. Ubrzo zatim, u humanom genomu otkriveni su i protoonkogeni koji su bili slični ili identični s onkogenima retrovirusa što je potvrdilo pretpostavku da su virusni onkogeni preuzeti od ćelija inficiranog organizma. Postavljena su i sledstvena pitanja: kako se protoonkogeni transformišu u onkogene, kakve su razlike među njima i da li su ti geni promenjeni ili neuobičajeno aktivni u humanim tumorima?

Onkogeni su mutantni aleli protoonkogena nastali njihovim mutacijama. U izvesnim slučajevima protoonkogen samo poseduje svojstva onkogena ukoliko u virusnom genomu dođe pod kontrolu promotora koji stimuliše njegovu ekspresiju. Produkti onkogena su proteini sa učešćem u složenim mehanizmima transmisije signala u ćeliji i kontroli njenog rasta, deobe i diferencijacije. U te produkte spadaju protein kinaze, polipeptidni faktori rasta, G-proteini i regulatorni nuklearni proteini. Smatra se da ovi onkogeni produkti ili »transformišući proteini« moraju tra-

jno biti prisutni kako bi održali malignu transformaciju ćelije što čine neprestanim podsticanjem ćelijske deobe.

Poseban značaj u ekspresiji neoplastičnog programa ćelije pridaje se faktorima rasta (epidermalni, trombocitni, transformirajući i dr.). Odgovor ćelije na faktore rasta odvija se u etapama sa tačno određenim redosledom. Prvu etapu u ovom procesu čini prenošenje signala indukovanih faktorima rasta i njihovo vezivanje za specifičan receptor na membrani ćelije, što indukuje alosteričku promenu receptora. Ovako izmenjen receptor se preraspodeljuje unutar membrane ili povezuje s ostalim membranskim proteinima, što indukuje brojne supstance unutar ćelije: enzime, proteine ćelijskog skeleta, faktore transkripcije, proteine koji se vezuju za DNK i enzime koji usmeravaju preteče deoksi i ribonukleotida ka replikaciji DNK. Aktivnost ćelijskih onkogena na nivou DNK odvija se promenom primarne strukture ili mutacijom, amplifikacijom i translokacijom onkogena. Neoplazma tako postaje haotičan sistem u kome se odigrava permanentno selekcija ćelijskih klonova najvećeg malignog potencijala. Koristi se ogroman genetski potencijal ćelije, neoplazma »seta duž genoma« i vrši ekspresija, onih gena koji će joj omogućiti adaptaciju u stalno promenljivim uslovima mikrosredine s nepredvidljivom evolucijom i aktivacijom izbora gena.

Od velikog značaja je i otkrivanje antionkogena ili tumorskih supresornih gena koji deluju inhibitorno na procese koje stimulišu onkogeni. Smatra se da su antionkogeni odgovorni za održavanje ćelije u visokodiferentovanom stanju sa izuzetno složenom genskom kontrolom. Njihov gubitak ili inaktivacija ide u prilog maligne alteracije ćelija.

Ključ enigme u nastanku maligne alteracije ćelije treba tražiti u proučavanju mehanizma regulacije ekspresije gena, kao i kontrolnih procesa rasta, proliferacije i diferencijacije ćelije i transmisije signala uključenih u ove procese.

Biohemijske karakteristike maligne ćelije

Maligno tkivo ima nestabilan dinamički sistem u kome se ne postižu stabilna i stacionarna stanja kao kod zdravih tkiva. Razvojem neoplastičnog programa, maligna ćelija postaje kompetitivna normalnim ćelijama koje ne mogu opstati u njenoj okolini. Enzimske i metaboličke promene unutar maligne ćelije nisu bez reda, već predstavljaju »biohemijsku strategiju« neoplazme. I pored velike biohemijske sličnosti između neoplastičnih i embrionalnih ćelija koje obuhvataju snažnu glikolizu, odsustvo kontaktne inhibicije, prisustvo fetalnih antigena i dr., onkogeneza nije blokirana ontogeneza, već proces disdiferencijacije ćelije koja gubi osnovne funkcionalne karakteristike.

Maligne ćelije biohemijski se značajno razlikuju od normalnih ćelija iako ne postoji specifičan enzim-

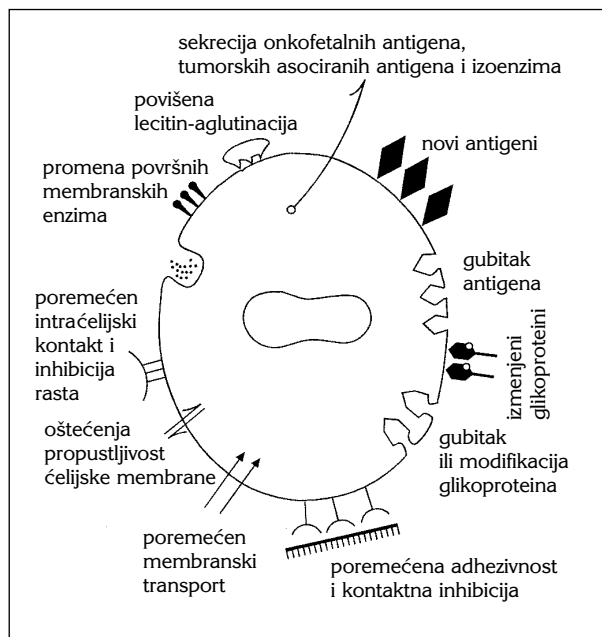
ski ili metabolički profil koji karakteriše neoplazme. Visoka aerobna glikoliza je najprisutnija biohemijska karakteristika malignog tkiva. U malignim ćelijama pojačana je sinteza proteina a smanjena ili odsutna aktivnost enzima koji su u vezi sa specifičnim ćelijskim funkcijama. Maligne ćelije uspješnije usvajaju različite metabolite kao što su glukoza, glutamin i drugi, a izrazito povećanje dejstva kolagenaze uslovljava destruktivno dejstvo i sposobnost infiltracije u okolinu. Zbog smanjenog broja mitohondrija, maligne ćelije imaju umanjen kapacitet disanja. U sastavu mitohondrija malignih ćelija nalazi se drugačiji spektar membranskih proteina i lipida što utiče na brže primanje i slabije otpuštanje jona kalcijuma. Ovo uslovljava smanjenje aktivnosti enzima peroksid-dismutaze koja uslovljava promenu ćelijskog redoks statusa i pojačanu peroksidaciju lipida. U malignim ćelijama povišena je aktivnost glukoza-6-fosfat dehidrogenaze i izražen metabolički put glukoze putem ciklusa pentoza-fosfata. Dominiraju ćelijski procesi anerobne glikolize putem kojih ćelije dolaze do potrebne energije. U njima se stvara višak laktata, što uslovljava intracelularnu acidozu i aktivaciju lizozomalnih hidrolaza.

U jedrima malignih ćelija pojačana je sinteza DNK i povišena aktivnost enzima koji učestvuju u tim procesima (ligaze, nukleaze i DNK-polimeraze). Povišena je aktivnost enzima timidin-kinaze i citidin-fosfat sintetaze koji uslovljavaju povećanu sintezu nukleotida kao prekursora nukleinskih kiselina. Zbog kvalitativnih promena u transkripciji pojavljuje se informaciona RNK (i-RNK) za onkofetalne proteine. Stimulisana je i sinteza poliamina čija je funkcija bitna za rast ćelije, sintezu DNK, RNK, proteina i modifikaciju transfer RNK (t-RNK).

Ćelijska membrana malignih ćelija bitno se razlikuje od membrane zdravih ćelija. Ona sadrži veću količinu holesterola, a manje nezasićenih masnih kiselina i glikolipida. Izmenjen je sastav glikoproteina i glikolipida membrane. Nestaju normalni antigeni ćelijskih membrana, a pojavljuju se specifični tumorski antigeni kao što su: karcinoembrionalni antigen, površinski ćelijski antigen i transplantacioni antigen.

Zbog nedostatka fibronektina i glikozil-transferaze smanjena je adhezivnost malignih ćelija što olakšava »otpuštanje« ćelija i njihovo metastatsko rasejavanje. Umanjena aktivnost adenil-ciklaze uslovljava smanjenje koncentracije cAMP-a što utiče na promene u sintezi i izgradnji citoskeleta malignih ćelija, njihove forme, motiliteta, adhezivnosti i brzine rasta. Biohemijske promene unutar malignih ćelija dovode do kvantitativnih i kvalitativnih promena različitih sastojaka telesnih tečnosti u organizmu što utiče na patološke promene biohemijskih nalaza u krvi i urinu. Na slici 3. šematski su prikazane biohemijske i strukturne promene unutar maligne ćelije.

Tumorske ćelije shodno fenotipu maligniteta proizvode karakteristične supstance koje prelaze u cirkulaciju. Može se videti da su promenama zahva-



Slika 3 Šematski prikaz biohemijskih i strukturnih promena u malignoj ćeliji

ćena ćelijska jedra, citoplazma i površina ćelija. Tako se na primer u ćelijskom jedru menja struktura hromozoma, proteina koji su povezani sa DNK, vrši modifikacija t-RNK i izmena enzimskog profila. U tumorskim ćelijama se formiraju onkofetalni antigeni koji su normalno svoju funkciju ostvarivali u toku embriogeneze. Na površini ćelije takođe dolazi do čestih izmena na osnovu kojih je moguće razlikovati malignu ćeliju od normalne diferencirane ćelije. To znači da se na površini ćelije formiraju novi antigeni, dok drugi površinski antigeni iščezavaju. Menja se i glikoproteinska struktura ćelijske membrane, što dovodi do izmena u transportu i permeabilitetu ćelijske membrane. Intraćelijska komunikacija između tumorskih ćelija je manja nego između grupe normalnih ćelija, što menja adhezivnost i kontaktnu-inhibiciju. Ovako izmenjene ćelije stvaraju i izlučuju supstance koje su nazvane *tumorski markeri*, koji mogu da se klasifikuju kao: 1) antigeni, 2) hormoni, 3) serumski proteini i 4) enzimi (6).

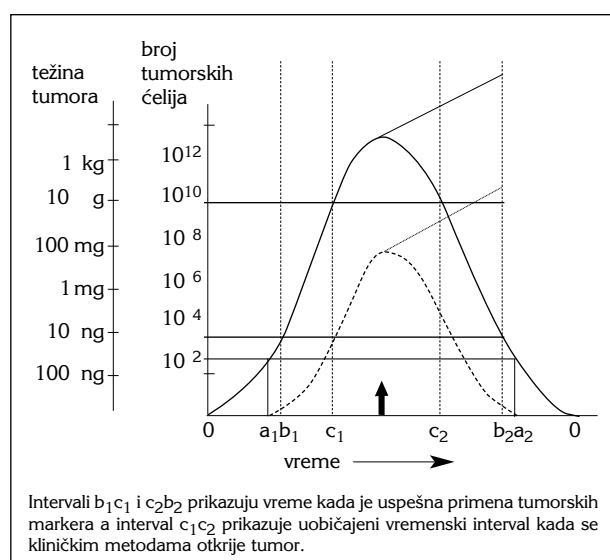
Funkcionalne karakteristike malignog procesa

Prvi stupanj u razvoju maligne neoplazme predstavlja prestanak normalnih funkcija ćelije i razvoj njene autonomije. Maligna ćelija svu svoju energiju usmerava na rast i proliferaciju kao osnovnih funkcija. Neophodno je da ćelije poprime svojstva invazivnosti i metastaziranja da bi tumor stekao karakteristike malignog procesa. Bitan momenat koji prethodi ovim pojavama je smanjenje adhezivnosti između malignih ćelija što omogućava njihovo odvajanje od primarnog tumora. Proces metastaziranja najbolje se

može predstaviti sledećim primerom: na svakih 1 000 tumorskih ćelija odvaja se samo 1 ćelija od kojih samo 1 na 1 000 preživi put kroz krvne i limfne sudove do mesta metastaziranja. Prema iznetom matematičkom modelu samo 1 od milion malignih ćelija poseduje sposobnost da postane baza daljeg metastaziranja. Prema istraživanjima drugih autora samo 1 od 10 000 odvojenih malignih ćelija osniva novu tumorsku koloniju dok 24 sata po ulasku u krvnu cirkulaciju preživi samo 0,1% malignih ćelija. Razlog verovatno leži u susretu ovih ćelija s mononuklearnim fagocitima, citotoksičkim T-limfocitima i NK-ćelijama kao i mehaničkim oštećenjima do kojih dolazi prolaskom kroz uske otvore krvnih kapilara.

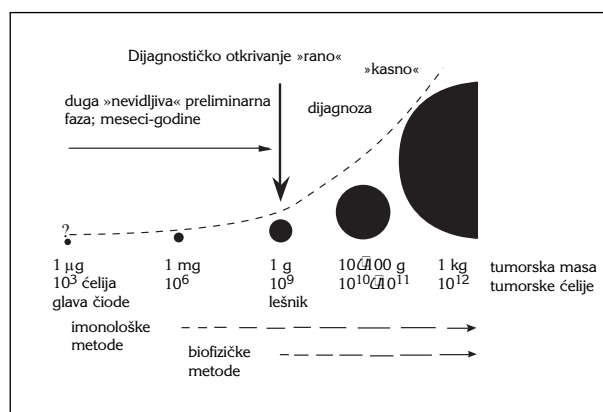
Kritičan momenat u evoluciji maligne neoplazme predstavlja dostizanje takve veličine koja onemogućava postojećoj vaskularizaciji da obezbedi oksigenaciju i priliv nutritivnih materija za dalji razvoj malignog tkiva. Kod solidnih tumora postoji prevaskularna faza u toku koje tumor raste sporo i linearno u funkciji vremena, a ishrana i oksigenacija su obezbedeni procesom difuzije. Primer je »karcinom *in situ*« kod koga broj ćelija iznosi oko 1 milion, a veličina oko 1 milimetar. Dalji porast tumorske mase direktno zavisi od angiogeneze i neovaskularizacije tumora, kada brzina rasta dobija eksponencijalni karakter dostižući ubrzo veličinu od 1–2 cm u prečniku. Na slici 4. prikazan je rast primarnog malignog tumora i početak metastaziranja u odnosu prema veličini tumora i broju malignih ćelija.

Primenom klasičnih dijagnostičkih metoda kao što su: x-zruci, ultrasonografija i kompjuterizovana tomografija, tumor najranije može biti otkriven kada dostigne veličinu »lešnika«, težinu od 1 gram ili 10^9 tumorskih ćelija (Slika 5). Imunološkim »*in vitro*« metodama uključujući i primenu tumorskih markera,



Slika 4 Kriva rasta primarnog tumora (———) i početak metastaziranja (- - - -) pre i posle uspešnog terapijskog postupka

tumor se najranije može otkriti kada sadrži 10^6 (1 milion) ćelija ili poseduje težinu od 1 mg. U toku dugotrajnog perioda rasta mogu proteći meseci i godine dok tumor ne bude otkriven kada je i realno očekivati pojavu metastaza sa znatno lošijom prognozom daljeg toka bolesti (7).



Slika 5 Razvoj tumora i mogućnost njegovog otkrivanja pomoću dijagnostičkih imunoloških i biofizičkih metoda

Većina pacijenata ne umire usled posledica koje izaziva primarni tumor, već usled efekata koje izazivaju metastaze ovog tumora. Iz ovog razloga je veoma značajno da se primarni tumor otkrije što je moguće ranije. Na slici 5. prikazan je razvoj tumora i mogućnost njegovog otkrivanja pomoću imunoloških i biofizičkih dijagnostičkih metoda.

Kriterijumi u proceni aktivnosti tumora

Dijagnostika malignih tumora obuhvata utvrđivanje kliničkog stadijuma bolesti (»stejdžing«), histološkog tipa maligne neoplazme, stepena histološke diferencijacije ćelija (gradus) i analizu specifičnih receptora u tkivu tumora ako je to moguće. Terapijski plan zasniva se prema iznetom »patogramu«, a uspešno lečenje pretpostavlja odsustvo bilo kakve tumorske aktivnosti i normalne (referentne) nivoe tumorskih markera u krvi. U pogledu praćenja rezultata terapije od velike važnosti je pravilna procena stepena remisije, pri čemu je neophodno razlikovati parcijalnu i kompletnu remisiju. U toku svake kliničke provere potrebno je registrovati stepen tekuće tumorske aktivnosti.

Recidiv predstavlja ponovnu pojavu maligne neoplazme koja je mikroskopski identična s primarnim tumorom koji je klinički iščezao kao rezultat lečenja. Klinički, bolesnik ne sme da pokazuje znake oboljenja tokom 2 uzastopna pregleda u razmaku od 1–2 meseca. Rani recidivi nastaju unutar prve postoperativne godine, a retko se javljaju poste perioda od 2 godine, i tada se nazivaju poznim (kasnim) reci-

divima. Pojava malignog tumora 5 godina posle primarne terapije, tretira se kao zasebna novonastala maligna neoplazma. Ukoliko u toku operativnog zahvata zaostane tumorsko tkivo u organizmu i nastavi kontinuirano progresivno bujanje, tada se naziva *rezidualni* ili *zaostali tumor*. Klasifikacija stepena tumorske aktivnosti trebalo bi da se izvrši u skladu sa kriterijumima iznetim na *tabeli III*.

Tabela III Stepene tumorske aktivnosti (Schlegel i sar.)

Stepen tumorske aktivnosti	Internacionalni termini
A ₀	– bez evidencije bolesti (NED) – kompletna remisija (CR)
A ₁	– sumnjiva tumorska aktivnost
A ₂	– stabilan tok bolesti (SD) – bez promena (NC) – parcijalna remisija (PR)
A ₃	– progresija bolesti (PD)

Tabela IV Klasifikacija humanih tumora prema TNM sistemu

T = primarni tumori	N = tumori limfnih čvorova	M = distalne metastaze
T ₁ = mali tumori, neinvazivnog rasta	N ₀ = bez metastaza na limfnim čvorovima	M ₀ = bez vidljivih metastaza
T ₂ = tumori srednje veličine, sa slabim širenjem u okolna tkiva	N ₁ = regionalne, krajnje proksimalne, neproliferativne metastaze limfnih čvorova	M ₁ = metastaze udaljenih organa
T ₃ = veliki tumori, odgovarajuće širenje u okolna tkiva	N ₂ = regionalne, proliferativne metastaze limfnih čvorova	M ₂ = prisustvo nedostupnih udaljenih metastaza
T ₄ = jako veliki tumori, ekstenzivno širenje u okolna tkiva	N ₃ = ekstenzivne, proliferativne metastaze limfnih čvorova	

UICC (Union Internationale Contre le Cancer) je klasifikovao humane tumore prema TNM-sistemu u primarne tumore (T), metastaze limfnih čvorova (N je lat. = nodus) i distalne metastaze (M). Ova klasifikacija je prikazana u *tabeli IV*.

Stupanj malignih tumora je takođe okarakterisan i sledećim faktorima: 1) lokalizacijom i veličinom tumora, 2) dužinom vremena u kome se tumor razvio, 3) brzinom rasta, 4) odbrambenom snagom pacijenta, i 5) uspehom terapijskih mera.

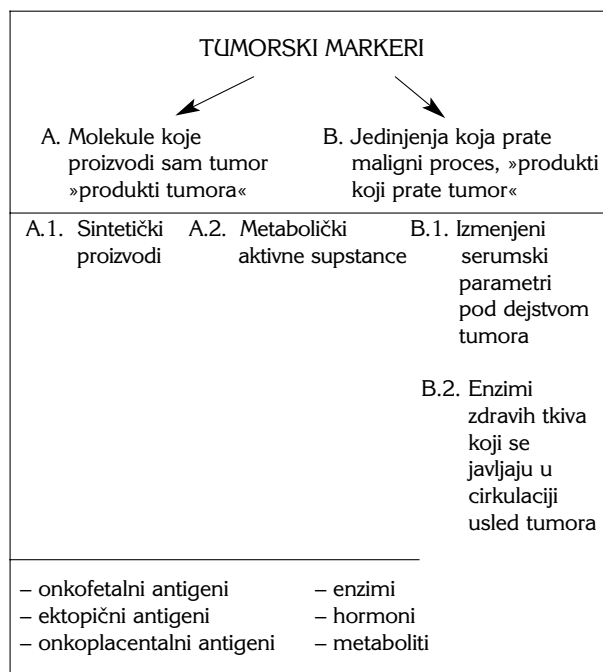
Klasifikacija tumorskih markera

U *tabeli V* prikazana je klasifikacija tumorskih markera koja se zasniva na podeli na ona jedinjenja koja stvaraju sami tumori (produkti tumora) i na ona koja prate maligne procese (produkti koji prate tumor) (6, 8–12).

Produkti koje proizvode tumori dele se na sintetizovane proizvode i metabolički aktivne supstance. U sintetizovane proizvode spadaju: onkofetalni antigeni, ektopični (nenormalni) antigeni, i onkoplacentalni antigeni. Za dijagnozu tumora veoma su značajni onkofetalni antigeni. Radi se o antigenima koji se normalno jedino sintetišu u izvesnim ćelijama u toku embrionalnog ili fetalnog razvoja. Kod zdravih odraslih osoba nalaze se u jako niskim koncentracijama. Kod pacijenata s malignim tumorima njihova koncentracija se značajno povećava. Od ovih jedinjenja svakako su najpoznatiji karcinoembriogeni antigen (CEA) i alfa-1-fetoprotein (AFP).

Izmenjeni metabolizam tumorskih ćelija dovodi do sinteze izvesnih jedinjenja koja se ne formiraju u normalnim ćelijama. Radi se o tzv. ektopičnim proizvodima, i to naročito o enzimima glikolize, biosinteze proteina i biosinteze nukleinskih kiselina. Ova jedi-

Tabela V Klasifikacija tumorskih markera na biohemijskoj osnovi



njenja imaju međutim veoma nisku specifičnost što umanjuje njihovu dijagnostičku vrednost.

Izvesni tumori proizvode molekule koji se pod normalnim fiziološkim uslovima jedino stvaraju u placenti. Radi se o tzv. onkoplacentalnim sintetičkim proizvodima od kojih su najpoznatiji humani horiogonadotropin (HCG) i specifični β -1-glikoprotein (SP1).

U drugoj grupi su tzv. »proizvodi koji prate tumore« u koje spadaju drugi serumski parametri i brojni proteini koje se formiraju više ili manje kao sekundarni u toku malignog procesa. S obzirom da su manje specifični, koriste se kao dodatni, fakultativni markeri koji ukazuju na maligni proces i služe za praćenje oboljenja. Ovde spada npr. feritin i β -2-mikroglobulin.

Enzimi i izoenzimi (*Tabela VI*) su retko specifični za odgovarajući tumor. Povećavaju se usled tumora i/ili metastatskih infiltracija u zdravo tkivo. Od enzima značajna je prostatična kiselna fosfataza, koja se povećava kod primarnog karcinoma prostate i γ -glutamilttransferaza koja se povećava kod primarnog karcinoma jetre i metastaza u jetri. Od drugih serumskih parametara treba pomenuti neke molekule koji trpe

Tabela VI Enzimi kao tumorski markeri

Enzim	Tip karcinoma
Alkohol dehidrogenaza	Jetra
Aldolaza	Jetra
Alkalna fosfataza	Kost, jetra, leukemija, sarkom
Alkalna fosfataza-placentalna	Ovarijumi, pluća, trofoblastni, gastrointestinalni seminom, Hodgkin
Amilaza	Pankreas, različiti
Aril-sulfataza B	Kolon, dojka
Kreatin kinaza-BB	Prostata, pluća (male ćelije), dojka, kolon, ovarijumi
Esteraza	Dojka
Galaktoziltransferaza	Kolon, bešika, gastrointestinalni, različiti
γ -glutamilttransferaza	Jetra
Heksokinaza	Jetra
Laktat-dehidrogenaza	Jetra, limfomi, leukemija, različiti
Leucin-aminopeptidaza	Pankreasni, jetra
Neuron-specifična enolaza	Pluća (male ćelije), neuroblastom, karcinoidni, melanom, feohromocitom
5'-nuklotidaza	Jetra
Prostatična kiselna fosfataza	Prostata
PSA	Prostata
Piruvat kinaza	Jetra, različito
Ribonukleaza	Različito (ovarijumi, pluća)
Sijalitransferaza	Dojka, kolon, pluća
Terminalna deoksitransferaza	Leukemija
Timidin kinaza	Različito, leukemija, limfomi, pluća (male ćelije)

Tabela VII Hormoni kao tumorski markeri

Hormon	Tip karcinoma
ACTH	Cushingov sindrom, pluća (male ćelije)
Antiidiuretini hormon	Pluća (male ćelije), kora nadbubrega, pankreas, duodenum
Bombesin	Pluća (male ćelije)
Kalcitonin	Medularna tireoidea
Gastrin	Glukagonom
Hormon rasta	Pituitarni adenom, bubreg, pluća
hCG	Embrionalni, horiokarcinom, testikularni (nonseminomi)
Humani placentalni laktogen	Trofoblastni, gonade, pluća, dojka
Neurofizini	Pluća (male ćelije)
Paratiroidni hormon	Jetra, bubreg, dojka, pluća, drugo
Prolaktin	Pituitarni adenom, bubreg, pluća
Vazoaktivni intestinalni peptid	Pankreas, bronhogeni, feohromocitom, neuroblastom

sekundarne promene, kao što su neki antigeni (npr. komponente krvnih grupa CA 19-9 i CA 12-5.

U tabelama VII–XI prikazana je sveobuhvatna podela tumorskih markera. Kako su u tabeli VI navedeni enzimi koji se koriste kao tumorski markeri ovde se prikazuju hormoni, antigeni, serumski proteini, itd.

Očekuje se da će poznavanje sekvence humanog genoma i identifikacija svih gena omogućiti otkrivanje onih gena koji su različiti ili iskrivljeno izraženi kod karcinoma. Ovakva poznavanja treba da omoguću predviđanje individualnih predispozicija prema karcinomu i razvoj efektivne strategije prevencije, npr. u pogledu ishrane, načina života, hemoprevencije itd.

Shodno iznetom, tumorski markeri da bi koristili pri dijagnostikovanju u praćenju malignih procesa moraju da poseduju sledeće karakteristike: 1) da su u jasnoj vezi s malignim procesom, 2) da su u korelaciji s masom tumora, 3) da pružaju informaciju o tipu tumora, njegovoj lokalizaciji i stupnju oboljenja, 4) da ukazuju koju terapiju treba koristiti, i 5) da omogućuju prognozu. Međutim, tumorski markeri retko mogu da posluže za rano otkrivanje oboljenja i to pre svega zbog loše specifičnosti i osetljivosti.

Tabela VIII Onkofetalni antigeni kao tumorski markeri

Naziv	Priroda	Tip karcinoma
AFP	Glikoprotein, 70 kDa, 4% UH	Hepatocelularni, germinativne ćelije (neseminom) Kolon
β-onkofetalni antigen	80 kDa	
Karcinofetalni feritin	Glikoprotein, 600 kDa	Jetra
CEA	Glikoprotein, 22 kDa, 50% UH	Kolorektalni, gastrointestinalni, pankreasni, pluća, dojka
Pankreasni onkofetal antigen	Glikoprotein, 40 kDa	Pankreasni
Antigen skvamozne ćelije	Glikoprotein, 44–48 kDa	Cervikalni, pluća, koža, glava i vrat (skvamozni)
Tennessee antigen	Glikoprotein, 100 kDa	Kolon, gastrointestinalni, mokraćna bešika
Tkivni polipeptidni antigen	Citokeratini 8, 18, 19	Različiti (dojka, kolorektalni, ovarijalni, mokraćna bešika)

Tabela IX Mucinski (ugljenohidratni) tumorski markeri

Naziv	Antigen i izvor	Antitelo	Tip karcinoma
CA 125	Glikoprotein, 200 kDa, OVCA 433	OC 125	Ovarijalni, endometrijalni
Episialin	Glikoprotein, 400 kDa	DF3 i 115D8	Dojka, ovarijumi
CA 15-3	Visokomolekulski glikoprotein	BC4E549, BC4N154	Dojka, ovarijumi
CA 549	Visokomolekulski glikoprotein	B27.29	Dojka
CA 27.29	Visokomolekulski glikoprotein		
MCA	350 kDa glikoprotein	β-12	Dojka, ovarijumi
DU-PAN-2	Mucin, 1000 kDa peptidni epitop	DU-PAN-2	Pankreasni, ovarijalni, gastrointestinalni, plućni

Tabela X Tumorski markeri slični antigenu krvnih grupa

Naziv	Antigen i izvor	Antitelo	Tip karcinoma
CA 19-9	Sijilirani Le ^{xa} , SW-1116 kolon CA	19-9	Pankreasni, gastrointestinalni, hepaticni
CA 19-9	Le ^a i sijilirani Le ^a	19-5	Gastrointestinalni, pankreasni, ovarijalni
CA 50	Sijilirani Le ^a i afukozil oblik	C50	Pankreasni, gastrointestinalni, kolon
CA 72-4	Sijilirani Tn	B27.3, cc49	Ovarijalni, dojka, gastrointestinalni kolon
CA 242	Sijilirani UH	C242	Gastrointestinalni, pankreasni

Tabela XI Drugi tumorski markeri

Citokeratini
Tkivni polipeptidni antigen (TPA) Tkivni polipeptidni specifični antigen (TPS) Citokeratin 19 fragmenti (CYFRA 21-1) Antigen karcinoma skvamoznih ćelija (SCCA)
Proteini kao tumorski markeri
β2-mikroglobulin (marker multiplog mijeloma, hronične limfocitne leukemije), C-peptid (marker insulinoma), Feritin (marker karcinoma jetre, pluća, dojke i leukemije), Monoklonski imunoglobulin (marker multiplog mijeloma, limfoma), Protrombinski prekursor (marker hepatocelularnog karcinoma) BTA (eng. bladder tumor associated) marker tumora bešike Tiroglobulin (Tg) (tumorski marker tiroidnih karcinoma) Antitiroglobulinska antitela (Anti-Tg) Protein S-100 (marker melanoma i njegovih metastaza) Autoantitela (na različite antigene koje proizvode tumori) Hromogranini A (CgA), B (CgB) i sekretogranin II, III, IV i V.
Receptori i drugi markeri
Estrogeni (ER) Progesteronski receptori (PR) Androgeni receptori (AR) Receptor hepatocitog faktora rasta (HGF) Receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR)
Receptori i drugi markeri

Zahvalnost: Rad je finansiran na osnovu Ugovora br. 145010B sa MNTR Srbije.

TUMOR MARKERS: BIOCHEMISTRY AND CLASSIFICATION

Nada Majkić-Singh

*Institute of Medical Biochemistry, Clinical Centre of Serbia and Pharmaceutical Faculty,
Belgrade, Serbia and Montenegro*

Summary: Tumor marker is a substance present in, or produced by a tumor itself, or produced by the host in response to a tumor, that is used to differentiate a tumor from normal tissue or to determine the presence of a tumor based on the measurement in the blood or other fluids. Such a substance is found in cells, tissues, or body fluids. It is measured qualitatively or quantitatively by chemical, immunological, genomic, or proteomic methods to identify the presence of a cancer. Tumor markers are the biochemical or immunological counterparts of the differentiation state of the tumor. In general many tumor markers represent the re-expression of substances produced normally by embryogenically related tissues. The first tumor marker reported was the Bence-Jones protein. Many years after Bence-Jones' discovery, scientists identified numerous hormones, enzymes, isoenzymes, and other proteins that, in malignancy, alter their concentration in biological fluids. The impact of new discoveries and technologies, such as microarrays, mass spectrometry, artificial neural networks, and other bioinformatics tools, has not yet been realized. However, these technologies could raise the field of tumor biomarkers to new heights. In this paper development, biochemistry and functional characteristics of malignancy are described, as well as classification of known tumor markers.

Key words: tumor markers, malignancy, development, biochemistry, functional characteristics, classification

Literatura

1. Bence-Jones H. Papers on chemical pathology. Lecture III. *Lancet* 1847; ii: 269–72.
2. Sell S. Cancer markers of the 1990s. *Clin Lab Med* 1990; 10: 27–31.
3. Knudson AG Jr. Hereditary cancer, oncogenes, and anti-oncogenes. *Cancer Res* 1985; 45: 1437–81.
3. Zhang Z. Combining multiple biomarkers in clinical diagnostics – A review of methods and tissues. In: Diamandis EP, Fritsche HA, Lilja H, Chan DW, Schwartz MK, eds. *Tumor markers: Physiology, pathobiology, technology and clinical applications*. Washington DC: AACC Press, 2002: 133–39.
4. Palmer-Toy D, Kuzdzal S, Chan DW. Proteomic approaches to tumor marker discovery. In: Diamandis EP, Fritsche HA, Lilja H, Chan DW, Schwartz MK, eds. *Tumor markers: Physiology, pathobiology, technology and clinical applications*. Washington DC: AACC Press, 2002: 391–400.
5. Majkić-Singh N. *Biohemija tumora i tumorski markeri*, u: *Medicinska biohemija*, DMBSCG, 2006.
6. Đurđević S, Đurđević J. *U: Tumorski markeri u ginekološkoj onkologiji*, DMBJ, 1998.
7. Zigenbein R. *Tumor-Marker*, Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart 1982.
8. Schwartz MK. Enzyme Tests in Malignant Disease, In: Moss DW, Rosalki SB. Eds *Enzyme Tests in Diagnosis*, Arnold 1996; 189–214.
9. Diamandis EP, Fritsche HA, Lilja H, Chan DW, Schwartz MK, eds. *Tumor markers: Physiology, pathobiology, technology and clinical applications*. Washington DC: AACC Press, 2002.
10. Vogel M, Mueller MM. *Tumor Markers: Review and Clinical Applications*, IFCC 2002.
11. *Maligne bolesti: karcinom dojke, pluća, kolorektuma, testisa, ovarijuma*. Nacionalni vodič kliničke prakse, Ministarstvo zdravlja Republike Srbije, Septembar 2002.

Rad primljen: 28. 02. 2006

Prihvaćen za štampu: 24. 03. 2006