

Petra Hudler¹

Molekularni mehanizmi tvorbe zasevkov

Molecular Mechanisms of Metastasis

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: rak, zasevki, bio-označevalci

Širjenje zasevkov iz primarnega tumorja v oddaljene organe preko krvnega ali limfnega obtoka je najpogostejši vzrok smrti pri bolnikih z rakom. Molekularne in klinične študije so v zadnjem času razkrile nekatere pomembne mehanizme njihovega nastanka. Tvorba zasevkov zahteva usklajeno izražanje in delovanje številnih genov v tumorskih celicah in celicah okolnega tkiva. Vsi koraki v procesu nastajanja zasevkov (angiogeneza, prilepljanje zasevkov na stene žil, migracija, invazija in rast) igrajo pomembno vlogo v normalnih bioloških procesih, kot so razmnoževanje, embriogeneza, celjenje ran, migracija gladkih mišičnih celic in regeneracija jeter. Odkrivanje molekul in signalnih poti, ki prispevajo k tvorbi zasevkov, je ključnega pomena za razvoj diagnostičnih in napovednih testov ter za iskanje novih terapevtskih tarč za zdravljenje metastatske bolezni.

ABSTRACT

KEW WORDS: cancer, metastases, biomarkers

The spread of metastases from a primary site through blood or the lymphatic system, which results in the establishment of secondary tumors in distant locations, is the main cause of death in cancer patients. Recent molecular and clinical studies have expanded knowledge of mechanisms implicated in metastasis formation. The development of cells with metastatic potential requires a coordinated expression and function of genes in both tumor cells and cells from surrounding tissues. All of the events involved in the metastatic cascade (i.e. angiogenesis, adhesion, migration, invasion, and growth) also play an important role in normal biological processes, such as reproduction, embryogenesis, wound healing, smooth muscle cell migration, lymphocyte trafficking and liver regeneration. The identification of molecules and signal pathways that contribute to metastasis is important for developing novel diagnostic and/or prognostic tests and for discovering novel therapeutic strategies to combat metastatic disease.

¹ Asist. dr. Petra Hudler, univ. dipl. mikrobiol., Medicinski center za molekularno biologijo, Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; petra.hudler@mf.uni-lj.si

UVOD

Invazija rakastih celic v okoliška in oddaljena tkiva ter tvorba zasevkov sta najnevarnejši in najbolj zahrbtni posledici rakastih obolenj (1). Zasevki oziroma metastaze so raka- ste celice, ki se odcepijo od tumorske mase in vstopijo v gostiteljevo okoliško tkivo oziroma v limfni ali krvni žilni sistem ter potujejo na druga mesta v telesu, kjer lahko vzpostavijo sekundarno kottišče (žarišče) raka (1, 2). Številna vprašanja o mehanizmi nastanka zasevkov, njihovem preživetju v obtoku ter sposobnosti razmnoževanja na drugotnih mestih ostajajo tudi po desetletjih raziskav še vedno nerešena.

Študije so pokazale, da lahko zasevki nastanejo zelo zgodaj v razvoju tumorjev, verjetno še pred odkritjem primarnega tumorja ter pred pojavom bolezenskih znakov (3, 4). Dogaja se tudi, da primarnega tumorja sploh nikoli ne odkrijemo, diagnosticiramo le metastatski rak neznanega izvora (5). Večinoma pa odkrijemo zasevke šele po diagnozi primarnega tumorja oziroma se ti pojavijo mesece ali celo leta po operaciji in navidezni ozdravitvi – zasevki namreč lahko po kolonizaciji novega tkiva ostanejo v obliki mikrokolonij (mikrometastaz) in se sprva sploh ne razmnožujejo in torej ne povzročajo bolezenskih znakov. Znani so primeri, ko se je metastatska oblika bolezni razvila 22 let po totalni resekciji primarnega tumorja (3).

Kljub napredku pri razvoju diagnostičnih metod, kirurškem in radiološkem zdravljenju, paliativni negi bolnikov ter izboljšanih in usmerjenih metodah zdravljenja s citostatiki (snovi, ki zavirajo celično rast in razmnoževanje) oziroma kemoterapevtiki (izraz tukaj uporabljamo za snovi, ki preprečijo razvoj in/ali uničujejo hitro deleče se celice, med katere sodijo tudi rakaste), je smrtnost bolnikov z rakom zaradi razvoja metastatske bolezni zelo visoka (6). Smrt nastopi zaradi poškodb organov, v katerih so zasevki, paraneoplastičnega sindroma (neznačilne težave, ki se pojavljajo pri nekaterih bolnikih z rakom zaradi biološko aktivnih snovi, ki jih izloča tumor) ali zaradi zapletov pri zdravljenju (1, 6). Znanstveniki ocenjujejo, da ima približno 30% bolnikov z rakom zasevke prisotne že ob prvi diagnozi. Nadaljnjih 30–40%

ima skrite zasevke, ki jih z današnjimi diagnostičnimi metodami ne moremo zaznati. S pomočjo kirurških posegov lahko ozdravimo manj kot tretjino novo odkritih bolnikov z rakom (1). Veliko oviro pri zdravljenju metastatske bolezni predstavlja tudi biološka raznolikost (heterogenost) metastaz, saj kljub temu, da zasevki pogosto obdržijo značilnosti matičnega tumorja, raziskave kažejo, da so v resnici genetsko drugačni od malignih celic primarnega tumorja (1, 6, 7).

Standardni klinični postopki za prepoznavanje zasevkov temeljijo na rentgenski diagnostiki, slikanju z magnetno resonanco (MRI) oziroma z računalniško tomografijo (CT), pri bolnikih s solidnimi tumorji pa si zdravniki pomagajo še z uveljavljenim klasificiranjem po sistemu TNM (angl. *T* – tumor (tumor), *N* – lymph node (bezgavka), *M* – metastasis (metastaza)) (8, 9). Zasevke lahko zdravimo kirurško, pogosteje pa z obsevanjem, kemoterapijo, biološko terapijo (oblika sistemskega zdravljenja raka z uporabo tarčnih zdravil in/ali imunomodulatorjev, ki spodbudijo naravni imunski odziv proti rakastim celicam, zmanjšujejo napredovanje raka ali ustavijo rast rakastih celic), hormonsko terapijo (oblika sistemskega zdravljenja raka z namenom zmanjšanja napredovanja raka ali kot dopolnilno zdravljenje po popolni kirurški odstranitvi tumorja) ali s kombinacijo naštetih. Kljub temu pa zasevki zelo zmanjšujejo možnost, da bi bolnik ozdravel.

Razumevanje mehanizmov, ki so odgovor ni za nastanek biološke heterogenosti celic v primarnih tumorjih in razsoj rakastih celic po telesu, bi lahko vodilo do odkritja novih bioloških označevalcev zasevkov in terapevtskih tarč ter s tem omogočilo razvoj novih diagnostičnih metod in izboljšanih metod zdravljenja (3, 7).

PROCES TVORBE ZASEVKOV

Proces tvorbe zasevkov oziroma celic z malignim potencialom je zapleten in vključuje več korakov, za katere so značilne številne interakcije med zdravimi gostiteljevimi (bolnikovimi) in tumorskimi celicami (1).

Rakaste celice v primarnih tumorjih med razmnoževanjem pridobivajo nove genetske in epigenetske (dedne spremembe v izraža -

nju genov, ki niso posledica sprememb v zapisu DNA, ampak posledica posebnih mehanizmov, kot sta metilacija DNA in preurejanje kromatina) spremembe, zato so primarni tumorji običajno heterogeni in sestavljeni iz celic z različnimi kariotipi. Te celice imajo tudi drugačne površinske označevalce, metabolne poti, encime in hitrosti rasti ter so različno občutljive na citotoksična zdravila. Nekatere šele sčasoma pridobijo lastnosti, ki jim omogočajo invazivnost, in tako se možnost nastanka zasevkov poveča (7).

Ključni koraki v patogenezi metastaz so:

1. nastanek rakastih celic, ki pospešeno rastejo, se prehranjujejo s preprosto difuzijo in tvorijo tumorsko maso (običajno manjšo od 2 mm v premeru),
2. angiogeneza – nastanek žilja, ki omogoča dovajanje hranil in kisika v rastoči tumor,
3. razraščanje tumorja – nekatere celice pridobijo lastnosti, ki jim omogočijo lokalno invazijo v okoliško tkivo bolnika,
4. intravazacija (mobilne tumorske celice lahko vstopijo preko tankostenskih venul in limfnih žil v krvni obtok) in razsoj krožečih tumorskih celic (KTC) po telesu,
5. lepljenje in razmnoževanje KTC znotraj žilne stene ter *in situ* preobrazba v mikrometastaze (metastatske lezije, manjše od 2 mm) ali v makrometastaze (metastatske lezije, večje od 2 mm),
6. ekstravazacija – KTC pogosto tudi izstopijo iz krvnega obtoka v distalna tkiva, verjetno preko podobnega mehanizma, ki je odgovoren za začetno invazijo in
7. kolonizacija distalnih tkiv in tvorba niše (omejen prostor v ali na tkivih, kjer se nahajajo metastaze) v tkivu – nastanek skupkov tumorskih celic ali mikrometastaz, ki lahko mirujejo oziroma so speče (angl. *dormant*) tudi po več let, se celo nikoli ne razvijejo v makrometastaze ali pa se zaradi določenih signalov iz mikrookolja po določenem obdobju mirovanja pretvorijo v makrometastaze in se začno razmnoževati (3, 6, 7).

Čprav pri ljudeh lahko opazujemo le zadnjo fazo zasevkov, ko je distalna lezija dovolj velika, da jo zaznamo z uveljavljenimi diagnostičnimi metodami slikanja, pa so nekateri od teh

teoretičnih korakov že bili raziskani *in vivo* v poskusnih modelih (6). Dokazano je bilo, da pri vsaki stopnji procesa nastajanja zasevkov preživi le nekaj celic (1, 6). Tako verjetno le 0,01 % KTC uspešno tvori kolonije mikrometastaz (1, 6, 10). Iz študij na modelnih živalih so raziskovalci ocenili, da se lahko iz primarnega tumorja odcepi približno 1×10^6 celic na dan, ki vstopijo v krvni obtok. Okoli 85 % KTC se že v 5 minutah po vstopu v krvni obtok uniči v posebnem procesu apoptoze, imenovanem *anoikis* (oblika apoptoze, ki v telesu skrbi za uničenje epitelijskih celic, ki se slučajno odlučijo iz tkiva) (11). Ni znano, na kakšen način se majhen odstotek KTC temu procesu izogne (11, 12). Tudi druge študije so pokazale, da je tvorba zasevkov selektiven proces, v katerem preživijo le manjše subpopulacije tumorskih celic (1, 10).

MOLEKULARNI MEHANIZMI INVAZIJE

Vdor rakastih celic iz primarnega tumorja v bližnje okoliško tkivo pogosto označuje tudi začetek metastatskega procesa (6). V tem procesu se morajo tumorske celice genetsko in tudi fenotipsko spremeniti, da lahko prehajajo med različnimi anatomskimi kompartmenti – lokalna invazija preko epitelijske bazalne membrane iz primarnega tumorja v okoliško tkivo, intravazacija v limfni ali krvni obtok, transport po obtoku, ustavitve v obtoku in ekstravazacija v distalna tkiva ter kolonizacija in rast v novih tkivih (2). Lokalna invazija je prvi korak v metastatskem procesu in je izredno dinamičen mehanizem, ki vključuje spremembe v interakcijah med tumorskimi celicami, interakcijah med tumorskimi celicami in obdajajočim matriksom in poleg tega še razgradnjo ter preoblikovanje ekstracelularnega matriksa (ECM) (2, 6). Pri tem morajo celice sintetizirati številne encime in druge molekule – proteaze, ki so odgovorne za razgradnjo matriksa, molekule, ki sodelujejo pri reorganizaciji citoskeleta, in druge molekule, ki omogočijo migracijo tumorskih celic (2). Vse več dokazov je, da pri tem igra ključno vlogo epitelijsko-mezohimalni prehod (angl. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT), ki omogoči, da tumorske celice pridobijo invazivnost in mobil-

nost (2, 6, 12). EMT je normalen celični proces, ki omogoča zgodnje razvojne (embrionalne) procese, kot je na primer razvoj mezoderma, opisan pa je tudi pri različnih fizioloških in patoloških procesih (celjenju ran, razvoju fibroze v pljučih, ledvicah in drugih organih, napredovanju malignih tumorjev in zasevanju). Pri tem epitelijske celice spremenijo svoj fenotip in se pretvorijo v mezenhimske celice, ki ne tvorijo medceličnih povezav, in so zato bolj mobilne. Normalne epitelijske celice so ključne pri vzdrževanju strukture in funkcije organov in so povezane med seboj preko celičnih stikov in preko stikov z ekstracelularnim matriksom. V celične stike so vpleteni kadherini (transmembranski proteini, ki omogočajo, da so celice v tkivih povezane med sabo), medtem ko so za stike z matriksom odgovorni predvsem integrini (receptorji na površini celic, ki omogočajo povezave med tkivnimi celicami in okoljem, ki tkivo obdaja; sodelujejo pa tudi pri celičnem signaliziranju) (12). Ti proteini so povezani še s citoskeletom znotraj celic, tako da so epitelijske celice rigidne in nemobilne. Mezenhimske celice imajo bolj sproščeno strukturo, tvorijo manj celičnih povezav, imajo manj citokeratinskih molekul in so bolj mobilne. Pri preklopu fenotipa epitelijskih celic v mezenhimske verjetno sodelujejo transkripcijski faktorji Twist, Snail, Slug in SIP1, ki jih izločajo tumorske celice in celice tumorske strome (3, 12). Omenjeni transkripcijski faktorji običajno sodelujejo pri razvojnih procesih in se v celicah odraslih le redko izražajo. Zanimivi bi lahko bili v diagnostiki, saj bi njihova prisotnost v tkivih ali serumu kazala na možnost razvoja zasevkov. Tumorska stroma je celično mikrookolje, ki obdaja tumor, in je sestavljeno iz različnih gostiteljevih celic, kot so fibroblasti, ki izločajo rastne faktorje, faktorje angiogeneze in receptorje, vnetne celice, ki izločajo kemokine, tumorje nekrotizirajoči faktor (TNF), citokine in transkripcijske faktorje, ter endotelijske in limfatične celice, ki jih privabijo izločene signalne molekule in so udeležene pri procesu tvorbe novih žil (angiogeneza) (3). Posledica njihovega delovanja je zmanjšano izražanje E-kadherina (molekule, ki sodeluje pri celičnih stikih in vzdrževanju polarosti celic), zmanjšano izražanje epitelijskih označevalcev

(citokeratinov), povečano izražanje mezenhimskih označevalcev (vimentina in N-kadherina), povečana mobilnost celic ter izguba rigidnosti – celice postanejo podobne fibroblastom in lahko se poveča izločanje proteaz in fibronektina (2, 3, 12). Nastanek KTC je torej zelo zapleten proces in pri tem se v omenjenih celicah močno spremeni profil izražanja genov, pri čemer imajo pomembno vlogo tudi celice tumorskega mikrookolja (13, 14).

VSTOP IN PREŽIVETJE V KRVNEM OBTOKU

Mezenhimskim celicam podobne tumorske celice so zelo mobilne in lahko preko žilnega endotelija (intravazacije) vstopijo v krvni ali limfni obtok, kjer naposled krožijo. Zato rej jih v tej fazi imenujemo KTC (3). Krvni obtok je zaradi hemodinamičnih strižnih sil, prisotnosti imunskih celic in odsotnosti substrata za oprijemanje celic za KTC kruto okolje – dejstvo je, da tumorske celice rastejo le, ko so pritrjene na ustrezen medij (3, 6). Smrt celic, ki se odlepijo od podlage oziroma se v telesu odlučijo od tkiv, običajno nastopi zaradi posebnega mehanizma apoptoze, imenovanega *anoikis* (6). Že v zgodnjih sedemdesetih letih prejšnjega stoletja je Fidler s sodelavci pokazal, da po vstopu v krvni obtok prvih 24 ur preživi manj kot 0,1% radioaktivno označenih KTC (7, 15, 16). Poleg tega manj kot 0,01% KTC uspešno tvori pljučne zasevke (7, 15, 16). Poskusi *in vitro* so pokazali, da izražanje receptorjev tirozinskih kinaz in drugih signalnih molekul omogoči metastatskim celicam preživetje in na še neznan način preprečuje *anoikis* (6).

Ob preživetju pa se morajo KTC v žilah še pritrčiti na stene. Natančni mehanizmi pritrditve sicer niso znani, ena od možnosti je, da se na KTC nespecifično vežejo koagulacijski faktorji, ki celicam omogočijo lepljenje na steno žil, druga možnost je, da se celice zaradi svoje velikosti ob prihodu v majhne kapilare ustavijo, medtem ko gre pri tretji možnosti za to, da KTC izražajo specifične molekule na površini, ki se vežejo na receptorje na endoteliju žil (6, 7). Pri slednji KTC verjetno uporabijo mehanizem, podoben tistemu, ki ga uporabljajo levkociti pri prehodu skozi žile. Endotelijski E- in P-selektini so

glikoproteini, ki običajno usmerjajo nevtrofilce in limfocite na mesto vnetja in omogočijo šibko vezavo na žilni endotelij (6, 7). Nato se tvorijo še močnejše povezave med celicami in žilnim endotelijem, ki jih posredujejo adhezijske molekule na površini celic (kadherini in integrini) (6). Pri prvi zgoraj omenjeni možnosti pa se KTC verjetno vežejo na tkivni koagulacijski faktor, fibrinogen, fibrin in trombin, zaradi česar nastane majhen strdek, ki se ustavi v kapilarah (6). KTC po vezavi na žilni endotelij lahko sprožijo krčenje endotelija (podobno kot limfociti), kar jim omogoči vezavo na subendotelij in končno prehod v nova tkiva (6, 7).

Zanimivo je tudi odkritje, da niso vse kapilare enake (6). Endotelijske celice kapilar v različnih organih izražajo namreč različne površinske proteine. Brown s sodelavci je s pomočjo fagnega prikaza (metode preučevanja proteinskih interakcij s pomočjo bakteriofagov) odkril protein metadherin, ki se izraža na površini tumorskih celic raka dojke in se selektivno veže na žilje pljuč (19). Protitelesa in siRNA (kratke molekule dvoverižne RNA, ki imajo vlogo pri uravnavanju izražanja genov) proti metadherinu so v eksperimentalnih pogojih zmanjšala tvorbo zasevkov v pljučih, kar bi lahko izkoristili pri razvoju novih zdravil za zdravljenje metastatske bolezni (19).

Rakave celice se podobno širijo tudi po limfnih žilah, in sicer lahko vstopijo vanje na podoben način, kot je opisano zgoraj, ali pa preidejo v limfne kapilare preko krvne plazme, ki difundira skozi stene kapilar v okolno tkivo (7). KTC se lahko ustavijo v bezgavkah in se začno razmnoževati, lahko pa potujejo naprej do distalnih organov.

KOLONIZACIJA ODDALJENIH TKIV

Ko KTC vstopijo v tarčni organ in se znajdejo v novem mikrookolju, se morajo le-temu tudi prilagoditi (20). Nekatere celice zopet spremenijo fenotip, in sicer izgubijo mezenhimske lastnosti, in ponovno postanejo podobne epitelijskim. Temu mehanizmu pravimo mezenhimalni-epitelijski preklap (12). Tovrstne celice so manj mobilne in se zato lažje naselijo v novem tkivu ter zrastejo sprva v mi-

krometastaze, nato pa še v makrometastaze (2, 3). Dejstvo pa je, da je prilagoditev KTC na novo mikrookolje v distalnih tkivih dokaj neučinkovit proces. Sicer je res, da tumorji nenazadnje izločajo na milijone rakavih celic na dan, toda mikrometastaze v distalnih tkivih lahko, kot že rečeno, ostanejo speče in se sploh ne razrastejo (3, 7, 12, 20). Poskusi so pokazali, da so mikrometastaze res viabilne, vendar razlogi, zakaj se ne razmnožujejo, še niso popolnoma pojasnjeni (6).

Ena od možnosti je, da novo mikrookolje in imunski sistem nekako preprečujeta razmnoževanje (6, 7). Možno je tudi, da se pri teh celicah po preklopu v epitelijski fenotip celični cikl ustavi (7). Tretja možnost pa je, da je razraščanje mikrometastaz v makrometastaze odvisno tudi od tega, ali so mikrometastaze sposobne izločati signale, ki omogočijo angiogenezo, kar bi jim zagotovilo dovolj hranil in kisika za hitro rast (7, 10). Poskusi z inhibitorji angiogeneze so pokazali, da so zasevki ostajali v mirujočem stanju tudi zaradi ravnovesja med razmnoževanjem celic in apoptozo (21).

Mirujoči zasevki ne povzročajo bolezenskih znakov in jih z današnjimi diagnostičnimi metodami ne moremo odkriti (21).

PATOGENEZA ZASEVKOV IN VLOGA MIKROOKOLJA ODDALJENIH ORGANOV

Večina zasevkov malignih tumorjev se razra- ste le v določenih organih. Tako zasevke raka debelega črevesa običajno najdemo v jetrih, pljučih in trebušni votlini, le redko v kosteh in koži ter nikoli v ledvicah ali mišicah (22). Zasevke jetrnega in rektalnega raka najdemo najpogosteje v pljučih, medtem ko karcinom dojke pogosto tvori zasevke, ki se lahko razra- stejo v vseh zgoraj omenjenih organih (22, 23). Pri večini čvrstih tumorjev (rakasto tkivo, ki ne vsebuje cist ali drugih tekočinskih tvorb) je prisotnost metastaz v bližnjih bezgavkah kritični prognostični dejavnik, ki napoveduje prisotnost oddaljenih zasevkov in slabše preživetje (24). Pred več kot enim stoletjem je kirurg Stephen Paget preučeval podatke o avtopsijah 735 bolnic z rakom dojke in opazil nenaključen vzorec zasevkov v visceralnih organih in kosteh (22). Njegova hipoteza

»seme in zemlja« (angl. *seed and soil*) trdi, da se zasevki (semena) tumorjev razširijo in razrastejo le v točno določenih organih (zemlja) in da se metastatska bolezen razvije le, če so »semena« in »zemlja« kompatibilni (10). Leta 1928 je James Ewing postavil novo hipotezo, ki je spodbujala Pagetovo, in trdil, da je razsoj tumorskih celic odvisen od mehanskih in anatomskih dejavnikov, ki jih pogojuje žilni sistem, preko katerega potujejo te celice (10, 22). Kljub temu, da njegove trditve ne razložijo pogost pojav zasevkov v možganih, kosteh in adrenalnih žlezah, ki jih napaja manjši del krvnega obtoka, je njegova hipoteza obveljala skoraj do leta 1970, ko so eksperimentalna in klinična opažanja potrdila Pagetovo hipotezo (22). Sugarbaker je ugotovil, da čeprav je razsoj zasevkov do bližnjih organov odvisen od določenih anatomskih dejavnikov krvnega in limfnega obtoka, je njihov razvoj v oddaljenih sekundarnih organih odvisen predvsem od vrste tumorja in lastnosti gostiteljskega tkiva (10, 22). Poskusi na miših so pokazali, da se KTC lahko ustavijo v številnih organih, vendar sta njihov razvoj v mikrometastaze in makrometastaze ter razmnoževanje odvisna od vrste gostiteljskega organa (10). Zanimiv dokaz o organski specifičnosti zasevkov so opazili pri poskusu, kjer so mišim v karotidno arterijo vbrizgali tumorske celice dveh melanomov, K-1735 in B16. Pri miših, ki so jim vbrizgali celice K-1735, so odkrili zasevke v parenhimu možganov, pri miših, ki so jim vbrizgali celice B16, pa v ovojnicah možganov (10).

Uvedba peritonealno-venskega obvođa (drenaža ascitesa iz trebušne votline v veno preko cevke) pri paliativnem zdravljenju malignega ascitesa pri bolnicah z rakom ovarijev je dala priložnost preučiti razsoj malignih celic pri ljudeh. Celice malignega ovarijskega raka rastejo v trebušni votlini. Najdemo jih lahko proste v tekočini ali pa pripete na površino peritonealnih organov. Zanje je značilno, da se ne razsejejo v druge visceralne organe. Tarin s sodelavci je opazil, da se pri paliativnem zdravljenju napredovalega ovarijskega raka s peritonealno-venskim obvođom kljub temu, da se verjetno veliko tumorskih celic vrne v telo bolnika preko pljuč, redko razvijejo metastaze v pljučih in tudi drugih organih (22).

Klinične študije in opazovanja bolnikov z rakom ter raziskave, opravljene na poskusnih živalih, so potrdile, da se zasevki iz primarnega tumorja v večini primerov razširijo preko bližnjih regionalnih bezgavk, vstopijo preko limfnega obtoka v krvni in potujejo do drugih tkiv (23). Razvoj metastatske bolezni v oddaljenih organih je mestno-specifičen in odvisen od vrste primarnega tumorja, lastnosti krožečih tumorskih celic (odziva na kemotaktične faktorje in specifične rastne faktorje gostiteljskih tkiv), sposobnosti lepljenja zasevkov na celice tkiv ter tudi od mikrookolja sekundarnih organov (10, 25).

Mehanizmi, ki usmerjajo zasevke in omogočajo kolonizacijo sekundarnih tarčnih organov, so raznoliki in zaradi kompleksnosti slabo preučeni. Usmerjevalni receptorji (angl. *homing receptors*), kemokini ali kemotaktični citokini (majhni proteini, ki lahko sprožijo in usmerjajo migracijo bližnjih celic), adresini in receptorji z mestno-specifičnimi peptidnimi motivi na tarčnih organih sodelujejo pri pritrjanju zasevkov (24). Krožeče tumorske celice se odzivajo na topne kemokine iz tarčnih organov. Tako je interakcija med kemokinoma CCR7 in CCL12 pomembna pri razsoju zasevkov v bezgavke, vezava CXCR4 in CXCL12 pa je značilna pri razsoju v pljuča, jetra, kostni mozeg in možgane (24).

Adresini so ekstracelularni proteini na endoteliju venul in so ligandi za limfocite ter omogočajo prehod limfocitov preko endotelija žil v organe. Njihovo izražanje je tkivno-specifično.

Žile v organih izražajo receptorje z značilnimi peptidnimi zaporedji. Razsoj zasevkov in kolonizacija organov sta lahko odvisna od interakcij med temi proteini in proteini, ki jih izražajo krožeče tumorske celice (24).

Značilno za nekatere tumorske celice je tudi, da so sposobne priklicati celice kostnega mozga na različne predele telesa. Poleg tega tumorske signalne molekule delujejo na fibroblaste v tarčnem organu, da začno izločati fibronektin. Hematopoetske prekursorke celice iz kostnega mozga izražajo integrin $\alpha\beta 1$, s katerim se vežejo na fibronektin in ustvarijo skupke v organih, ki so verjetno niša za stabilizacijo krožečih tumorskih celic v tarčnem organu (26).

Zasevki v bližnjih bezgavkah

Zasevki v bezgavkah običajno pomenijo, da se je rak razširil, in so pomemben napovedni dejavnik poteka bolezni (25). Preden lahko najdemo zasevke v bližnjih bezgavkah so le-te povečane (tumorska limfadenopatija). Celice primarnega tumorja verjetno povzročijo preoblikovanje žilnega in limfnega sistema, preden lahko vstopijo mikrometastaze v bezgavke (24). Narejene so bile številne študije, da bi odkrili značilne molekularne vzorce, s katerimi bi lahko napovedovali nastanek zasevkov v bezgavkah. O'Donnell s sodelavci je pri bolnikih z rakom glave in vratu odkril značilen vzorec 116 genov, ki so dobro napovedovali zasevke v bezgavkah (27). Trije izmed omenjenih 116 genov so bili v prejšnjih študijah povezani z agresivnim metastatskim fenotipom raka dojk in trebušne slinavke (24). Pri raziskavah malignega melanoma, raka dojk, raka želodca in pljučnega raka so odkrili povišano izražanje kemokinskih receptorjev CXCR4 in CCR7, ki sta bila pomembna označevalca razširitve raka v bezgavke. CCR7 in njegova liganda, kemokina CCL19 in CCL21, sodelujejo pri migraciji limfocitov in dendritskih celic v bezgavke (24).

Zasevki v jetrih

Jetrni zasevki so glavni vzrok smrti bolnikov z rakom debelega črevesa, trebušne slinavke in hepatocelularnega karcinoma (25). Pri razsoju celic raka debelega črevesa so v proces vpleteni površinski glikani. Vežava malignih celic na jetrne celice je dodatno odvisna tudi od kalcija (24). Poleg tega so pri nekaterih metastatskih celicah debelega črevesa odkrili povišano izražanje tirozinske fosfatidaze PRL-3, ki je pomemben napovedni dejavnik jetrnih zasevkov. Od leta 2005 so v eksperimentalni klinični onkologiji začeli uporabljati specifično monoklonsko protitelo proti PRL-3 za določanje jetrnih zasevkov pri bolnikih z rakom debelega črevesa (25).

PDGFR- α in - β sta značilni molekuli pri metastatskih celicah raka trebušne slinavke, ki le-te usmerjajo v jetra. Inhibicija receptorja PDGFR s specifičnim monoklonskim protitelesom v kombinaciji z gemcitabinom (antimetabolitom, analogom pirimidina deoksicitidina, ki se veže v DNA in prepreči pom-

noževanje DNA ter celično smrt) se je izkazala kot uspešna pri zdravljenju raka trebušne slinavke in preprečevanju nastajanja zasevkov (28, 29).

V nasprotju z drugimi tkivnimi raki se zasevki hepatocelularnega raka najpogosteje naselijo kar v jetrih. Ye s sodelavci je s pomočjo tkivnih bio-čipov odkril, da so si celice primarnega tumorja in zasevki zelo podobni. To je v skladu s prejšnjimi študijami, ki so pokazale, da primarni tumorji pogosto zasevajo zelo zgodaj. Druge raziskave so pokazale, da pri razsoju sodelujejo proteini, ki igrajo vlogo pri celičnih povezavah in razgradnji matriksa, kot so IL-2R, MMP-9, CD37, α 9-integrin, serinska proteaza 5 in osteopontin (zunajcelični strukturni protein; organska komponenta kosti). Predvsem izražanje osteopontina je bilo v zasevkih močno povišano in njegova inhibicija je preprečila širitev zasevkov v jetra in v pljuča (25).

Jetrne celice izražajo tudi kemokin CXCL12, ki se veže z receptorji CXCR4, ki jih pogosto izražajo krožeče tumorske celice raka dojk in raka debelega črevesa (30). Manozni receptorji na jetrnem sinusoidnem endoteliju omogočajo preko oligosaharidov na njihovi površini vezavo zasevkov melanoma. Vnetni procesi v jetrih pospešijo zasevanje, ker se izloča IL-1, ki deluje na jetrni endotelij tako, da celice izražajo še več manoznih receptorjev (24). Celice nekaterih limfomov izražajo integrin α 4 β 1, ki se veže na usmerjevalni receptor na jetrnem endoteliju (VCAM-1) in je verjetno pomemben pri razsoju (31).

Zasevki v pljučih

Pljuča so drugi najpogostejši organ, kjer najdemo zasevke. Tumorji, ki najpogosteje zasevajo v pljuča, izvirajo iz dojk, sečnega mehurja, debelega črevesa, ledvic, glave in vratu ter kože (melanom) (7).

Pljučni endotelij izraža tri proteine (LU-ECAM-1, dipeptidil peptidaza IV in membranska dipeptidaza), ki jih tumorske celice izkoriščajo za pritrjanje (32). Rakaste celice dojk, ki izražajo metadherin, se prednostno vežejo na žile pljuč in so pomemben napovedni dejavnik razsoja bolezni (19). Tudi celice karcinoma trebušne slinavke, ki izražajo posebno obliko proteina CD44, najpogosteje kolonizirajo pljuča (24). Določanje te oblike

CD44 bi lahko bilo uporabno pri odkrivanju zasevkov, saj le nekatere rakaste celice izražajo omenjen protein in le-te se običajno razvijejo v zasevke.

Študije so tudi pokazale, da proteini, ki jih izločajo pljučne celice, lahko vplivajo na pljučne zasevke, tako da postanejo le-ti odporni proti kemoterapevtikom. Wilmanns s sodelavci je naredil poskus, kjer je opazil, da so rakaste celice debelega črevesa, ki rastejo v pljučih izogenskih mišk (mišk z istim genotipom), odporne proti doksorubicinu, medtem ko so bile enake celice v koži občutljive na to zdravilo. Odpornost zasevkov v pljučih je bila verjetno pogojena s povečanim izražanjem P-glikoproteina (deluje kot črpalka, ki odstranjuje toksične snovi iz celic) v zasevkih. Povečanega izražanja tega proteina v kožnih zasevkih niso opazili (7, 33).

Celice pljuč izražajo tudi kemokin CXCL12, ki veže CXCR4, ki ga izražajo zasevki raka dojke (24). Zeelenberg s sodelavci je odkril, da tudi celice raka debelega črevesa izražajo CXCR4, vendar v zgodnjih fazah razvoja le v nizkih količinah, ko pa pridejo celice v pljuča, se izražanje tega receptorja močno poveča. To dokazuje, da tudi mikrookolje tarčnega organa vpliva na izražanje genov v krožečih tumorskih celicah (30).

Zasevki v možganih

Možgani so zaščiteni s krvno-možgansko pregrado, za katero so značilne kapilare s tesno povezanim endotelijem, debela bazalna membrana in plast astrocitov, ki preprečujejo vstop večjih molekul (in seveda tudi celic) in ovirajo vstop hidrofiličnim snovem. Tumorske celice, ki lahko vstopijo preko pregrade, imajo posebne molekularne značilnosti (24). Astrociti izločajo različne citokine in rastne faktorje ter oblikujejo možgansko mikrookolje, na katerega se morajo tumorske celice prilagoditi. Poskusi s celično linijo iz možganskih metastatskih celic raka dojke so pokazali, da se te celice močno vežejo na astrocite (25).

Nekatere tumorske celice izražajo transferinske receptorje, na katere se veže parakrina oblika transferina, kar verjetno omogoči njihovo preživetje v možganih (24). Celice malignega melanoma izražajo nevrotrofinski receptor P75NTR, na katerega se veže živčni rastni faktor NGF (nevrotrofin), ki ga izlo-

čajo astrociti. Nevrotrofini tako sodelujejo pri invaziji zasevkov in poleg tega omogočijo tudi izločanje heparanaze iz celic glije, ki razgradi ekstracelularni matriks (24, 25).

Zasevki v kosteh

Zasevki v kosteh so najpogostejša lokalizacija raka dojke in raka prostate. Redkeje se pojavijo pri raku pljuč, maternice, sečnega mehurja, debelega črevesa, ščitnice, ledvic in pri multiplih mielomih (25). Patofiziologija kostnih zasevkov je kompleksna in vanjo so vpletene različne celične populacije (zasevki, osteoblasti, osteoklasti in endotelijske celice) in regulatorni proteini (steroidni hormoni, citokini in rastni faktorji) (7). Obstajata dve obliki kostnih zasevkov: osteoblastna vrsta, ki jo tvorijo maligne celice raka prostate, in osteoklastna vrsta zasevkov, ki jo najpogosteje tvorijo celice raka dojke (7, 24, 25). Osteoblastni zasevki sproščajo rastne faktorje, ki aktivirajo normalne osteoblaste, kar privede do zmanjšanja resorpcije in nalaganja novega kostnega tkiva (25). Določanje teh molekul v serumu ali tkivih bolnikov bi lahko bilo pomembno pri odkrivanju kostnih zasevkov. Ključne molekule, ki verjetno igrajo vlogo pri tvorbi kostnih zasevkov, so endotelin (ET-1), kostni morfogenetski proteini (angl. *bone morphogenetic proteins*, BMP), specifični antigen prostate (angl. *prostate specific antigen*, PSA), proteini signalne poti Wnt, transformirajoča faktorja $\beta 1$ in $\beta 2$ (angl. *transforming growth factor $\beta 1$, $\beta 2$* , TGF- $\beta 1$ in TGF- $\beta 2$), rastni faktor podoben insulinu (angl. *insulin-like growth factor*, IGF), fibroblastni rastni faktor (angl. *fibroblast growth factor*, FGF) in trombocitni rastni faktor (angl. *platelet-derived growth factor*, PDGF). Ti proteini delujejo tako, da pospešijo tvorbo in diferenciacijo kostnih celic v osteoblaste in pri tem deregulirajo signalne poti, ki uravnavajo normalno homeostazo kosti (7, 24, 25).

Osteoklastni zasevki povzročijo razgradnjo kostnega matriksa z metaloproteazami (25). Kostne metastaze sprožijo v osteoblastih, osteoklastih in celicah kostnega mozga signalne poti, ki vodijo v ponavljanje cikla razgradnje kostnega tkiva (7, 25). Tumorske celice izdelujejo protein, soroden paratiroidnemu hormonu (angl. *parathyroid hormone-related protein*, PTHrP), ki v osteoblastih sproži

izločanje liganda RANK (RANKL) in osteoprotegrina (OPG). Osteoblasti in stromalne celice kostnega mozga izražajo OPG, ki prepreči vezavo proteinskega kompleksa RANKL-RANK (aktivator NF- κ B). Porušeno razmerje teh treh proteinov povzroči, da se aktivirajo osteoklasti, kar vodi do razgradnje kostnega tkiva. Pri tem se sprostito še drugi rastni faktorji (DGF, GF-beta1, FGF in IGF), ki pospešijo izločanje PTHrP in tako spodbudijo ponoven začetek cikla aktivacije osteoklastov (24).

BIO-OZNAČEVALCI RAZSOJA PRIMARNEGA TUMORJA

Bio-označevalci so indikatorji specifičnih bioloških stanj (34). To so lahko značilni molekularni podpisi normalnih bioloških procesov ali pa molekule, ki so značilne za patofiziološke procese, kot so napredovanje bolezni, odziv na zdravljenje in remisija rakastih bolezni (35, 36). Določanje tumorskih bio-označevalcev je v pomoč pri diagnostiki raka, odkrivanju napredovanja rakave bolezni – zaznavanju zasevkov, napovedovanju poteka bolezni in pri napovedovanju ter opazovanju odzivov bolnikov na zdravljenje (34, 37). Najpogosteje določamo njihovo prisotnost v krvi in urinu, lahko pa tudi v tkivih. Običajno so to molekule, ki so na površini ali v notranjosti rakavih celic, oziroma proteini, ki jih rakave celice izločajo, in prav slednji sodijo med najbolj uporabne, saj je njihovo določanje najmanj invazivno (kri, urin) (9, 37, 38). Gledano s stališča biokemije so to membranski antigeni, encimi, hormoni, poliamini, nukleozidi in proteinski produkti onkogenov oziroma tumorje zaviralnih genov (39). Cilj raziskav na področju odkrivanja tumorskih bio-označevalcev je razviti preproste, neinvazivne diagnostične teste, ki bodo zanesljivo napovedovali tveganje, prisotnost, stadij, bodoče vedenje tumorjev, ponoven pojav bolezni ali nastanek metastaz (35).

Kljub številnim študijam in odkritju molekul, značilnih za tumorje, je v klinični uporabi razmeroma malo bio-označevalcev, saj ti žal niso popolnoma zanesljivi. Njihove pomankljivosti so predvsem nizka specifičnost in občutljivost ter slaba napovedna vrednost (40). Poleg tega se nekateri označevalci lahko tvorijo v povišanih količinah tudi pri

normalnih fizioloških stanjih, kot so nosečnost, menstruacija, laktacija in pri nemaliginih procesih, kot je na primer vnetje (39).

Molekularne bio-označevalce (proteini, DNA, RNA in metaboliti) lahko razdelimo v grobem v več skupin. Diagnostični označevalci se uporabljajo za odkrivanje bolezni. Pri raziskavah raka je zgodnje odkrivanje bolezni izredno pomembno predvsem pri preprečevanju razsoja in posledično zniževanju smrtnosti bolnikov (41). Primera teh označevalcev v klinični uporabi sta c-kit (KIT), ki se uporablja za detekcijo gastrointestinalnih stromalnih tumorjev, in PSA za diagnozo raka prostate (8, 37, 42). Prognoistični označevalci so uporabni za napovedovanje poteka bolezni in lahko podajo informacijo o možnosti nastanka zasevkov pri določenih vrstah raka (37). Poleg tega so pomembni tudi pri opazovanju odzivov bolnikov na zdravljenje (41). Označevalci, ki jih uporabljajo v kliniki, so hormonski receptorji, proteaze, označevalci angiogeneze, receptorji rastnih faktorjev (HER-2/neu) in p53 (37). Sorodna skupina označevalcev so tudi napovedovalni označevalci, ki se uporabljajo pri izbiranju različnih terapij (37). Presejalni označevalci so pomembni pri iskanju rizičnih populacij za razvoj določene vrste raka in tudi pri zgodnjem odkrivanju tumorjev (43, 44).

Prvi bio-označevalec raka je odkril leta 1847 angleški zdravnik Henry Bence Jones (40). V urinu bolnikov z multiplim mielomom je odkril albuminozno snov, ki je bila v nasprotju z normalnim albuminom občutljiva na toploto. Biokemijsko naravo Bence-Jonesovega proteina so odkrili šele stoletje kasneje, in sicer je to temperaturno občutljiv paraprotein iz monoklonskih lahkih verig γ -globulina, ki ga izdelujejo tumorske celice (40).

V današnjem času se v kliniki najpogosteje uporabljajo označevalci, ki jih lahko zaznamo v serumu s preprostimi imunskimi testi in/ali z zaznavanjem mRNA s pomočjo metode verižne reakcije s polimerazo v realnem času (angl. *real time polymerase chain reaction*, RT-PCR) (9). Kljub temu ti metodi nista povsem zanesljivi, saj pri prvi predstavljajo velik problem nespecifičnost protiteles, nizka koncentracija označevalcev v krvi in drugi proteini, ki so v krvi v velikih količinah in lahko motijo občutljivost metode (12, 38).

Tabela 1. Izbor najpogosteje uporabljenih tumorskih bio-označevalcev v klinični onkologiji.

Tumorski bio-označevalac	Vrsta raka	Sorodne vrste raka ^a
Onkofetalni proteini		
<i>α-fetoprotein (AFP)^c</i>	Hepatocelularni karcinom, neseminomski germinalni tumorji	Rak debelega črevesa, želodca, trebušne slinavke
<i>Karcinoembrionalni antigen (CEA)</i>	Rak debelega črevesa, želodca, trebušne slinavke	Rak dojke, ščitnice, pljuč, ovarijev, maternice, jeter, sečnega mehurja
Hormoni		
<i>Horiogonadotropin (β-HCG)</i>	Rak moda ^d , jajčnikov ^d , horiokarcinom, drugi germinalni tumorji	Rak trebušne slinavke, pljuč, sečnega mehurja, dojke, želodca, jeter, širokega črevesa
Encimi		
<i>Nevronska specifična enolaza (NSE)</i>	Drobnocelični rak pljuč, nevroblastom	Wilmsov tumor, melanom, rak ščitnice, ledvic, mod, trebušne slinavke
<i>Prostatična kisl fosfataza (PAP)</i>	Rak prostate	Multipli mielom
Tumor spremljajoči antigeni		
<i>Karcinomski antigen CA 15-3</i>	Rak dojke	Rak jajčnikov, pljuč, jeter, trebušne slinavke, prostate, želodca
<i>Karcinomski antigen CA 19-9</i>	Rak želodca, trebušne slinavke, žolčnika	Rak debelega črevesa, požiralnika, jeter
<i>Karcinomski antigen CA 125</i>	Rak jajčnikov	Rak maternice, dojke, pljuč, prostate, požiralnika, želodca, jeter, trebušne slinavke, maligni mezoteliom peritoneja
<i>Mucinski karcinomski antigen (MCA)</i>	Rak dojke (metastatska oblika)	Gastrointestinalni/ urogenitalni karcinom, rak pljuč
<i>Prostatični specifični antigen (PSA)</i>	Rak prostate	—
Serumski proteini		
<i>β-2 mikroglobulin</i>	Rak pljuč, dojke	Rak trebušne slinavke, debelega črevesa in danke, limfomi, kronična limfatična levkemija
<i>S-100^f</i>	Nevrinom, glioblastom, astrocitom, meningeom, maligni melanom	—
<i>Tiroglobulin (hTG)</i>	Folikularni in papilarni rak ščitnice	—
Drugi tumorski bio-označevalci		
<i>Tkivni polipeptidni antigen (TPA)</i>	Rak pljuč, sečnega mehurja, prostate, jajčnikov, jeter, trebušne slinavke, ščitnice, glave in vratu, debelega črevesa	—
<i>HER-2/neu^g</i>	Rak dojke	Rak pljuč, sečnega mehurja, trebušne slinavke, Wilmsov tumor

a: Vrste raka, kjer tudi lahko zaznamo povišane koncentracije bio-označevalcev v serumu.

b: Benigna obolenja, pri katerih lahko zaznamo višje koncentracije tumorskega bio-označevalca v serumu.

c: AFP (α-fetoprotein) je onkofetalni plazemski protein, ki se izraža v povišanih koncentracijah pri zarodkih in novorojenčkih.

d: Običajno v kombinaciji z AFP.

e: Presejalni testi za določitev rizičnih skupin žensk, pri katerih obstaja možnost za razvoj horiokarcinoma.

f: S-100 so celični proteini, vpleteni v rast celic in diferenciacijo.

g: HER-2/neu (receptor ravnega faktorja, sorodnega EGFR) se določa v tkivih bolnikov, pri spremljanju poteka zdravljenja bolnic z rakom dojke se včasih meri tudi v serumu.

Klinična uporaba	Benigna obolenja ^b
Diagnostika, spremljanje poteka bolezni, presejanje pred presaditvijo jeter	Virusni hepatitis, ciroza jeter, nosečnost
Določanje stadija, spremljanje uspešnosti zdravljenja, diagnostika hepatocelularnega karcinoma	Kajenje, želodčne razjede, kronična vnetna črevesna bolezen, pankreatitis, hipotiroidizem, ciroza jeter, bronhitis
Diagnostika, spremljanje poteka bolezni, presejanje ^a	Kajenje marihuane, redko je povečan v nosečnosti in pri ženskah v post-menopavzi
Spremljanje poteka bolezni	Benigne bolezni pljuč, normalno nastaja v nevronih
Spremljanje poteka bolezni	Benigna hiperplazija prostate, rektalni diagnostični pregledi, določena zdravila, Gaucherjeva bolezen
Spremljanje poteka bolezni	Akutni hepatitis, benigne tvorbe v dojkah, jetrih, pljučih in ledvicah, ciste na jajčnikih, redko se poveča med nosečnostjo
Spremljanje poteka bolezni	Pankreatitis, bolezni žolčnika, ciroza, akutna faza cistične fibroze
Diagnostika, spremljanje poteka bolezni, določanje stadija	Menstruacija, nosečnost, ciste na jajčnikih, endometrijoza, ciroza
Spremljanje poteka bolezni	Akutni hepatitis, ciroza, nosečnost
Spremljanje poteka bolezni, presejanje	Benigna hipertrofija prostate, prostatitis, rektalni pregled
Spremljanje poteka bolezni	Povečana sinteza zaradi delitve celic, delovanje imunskega sistema, bolezni ledvic
Spremljanje poteka bolezni	Poškodbe centralnega živčnega sistema
Spremljanje poteka bolezni	Gravesova bolezen, tiroiditis, hipertiroidizem, nosečnost, golšavost
Spremljanje poteka bolezni	Vnetni procesi, infekcije dihalnih poti, ciroza, pankreatitis, diabetes
Spremljanje uspešnosti zdravljenja	–

Problem druge pa je slaba stabilnost mRNA, možnost navzkrižne kontaminacije vzorcev, zaznavanje psevdogenov in izražanje iskanih označevalcev v drugih, normalnih celicah (9).

Klinično odobrene bio-označevalce lahko razdelimo v dve glavni skupini, rakasti in tkivno-specifični označevalci. PSA je najbolj znan tkivno-specifični tumorski označevalac, ki se uporablja v diagnostiki in zaznavanju remisije bolezni (9, 38). Kljub številnim raziskavam ta označevalac ni popolnoma zanesljiv, saj je lahko razlogov za njegovo povišanje v človeškem telesu več. Njegova koncentracija v krvi je odvisna od starosti in rase bolnika, poviša pa se tudi pri rutinskih pregledih prostate, pri benignem povečanju prostate in pri vnetjih ter infekcijah (9). Dobra lastnost PSA je, da je specifičen, in njegovo povišanje pomeni, da je nekaj s prostatato zagotovo narobe (45).

α -fetoprotein (AFP) je onkofetalni protein, torej protein, ki nastaja normalno le med embrionalnim razvojem. Povečane koncentracije onkofetalnih proteinov pri odraslih so običajno posledica ponovne aktivacije genov, predvsem tistih, ki nadzorujejo rast celic in so v neposredni povezavi z malignimi procesi (39). AFP je dober označevalac, ki se uporablja za spremljanje bolnikov s hepatocelularnim rakom (8, 46). Pri teh bolnikih je AFP običajno zelo povišan. Višje koncentracije tega glikoproteina zaznamo tudi pri bolnikih z neseminomskimi germinalnimi tumorji in pa bolnikih z akutnim virusnim hepatitisom, jetrno cirozo in rakom trebušne slinavke, pljuč in želodca (39).

Karcinoembrionalni antigen (angl. *carcinoembryonic antigen*, CEA) je tudi onkofetalni protein in je eden od prvih klinično odobrenih tumorskih označevalcev. Uporablja se predvsem pri spremljanju bolnikov z rakom debelega črevesa in danke po operaciji in med zdravljenjem (39, 46). Sodi med tkivno-nespecifične označevalce, saj je njegova koncentracija povečana tudi pri raku želodca, trebušne slinavke, pljuč in dojk (46). Njegova druga pomanjkljivost je, da ga lahko najdemo tudi pri bolnikih z nemalignimi obolenji, kot so vnetna črevesna bolezen, pankreatitis in določene vrste vnetnih obolenj jeter (47).

Horiogonadotropin (angl. *human chorionic gonadotropin*, β -HCG) je hormon in je raz-

meroma dober tkivno-specifičen tumorski označevalac (8, 46). Uporablja se ga predvsem pri spremljanju bolnikov z germinalnimi tumorji. Rahlo povišanje tega proteina lahko zasledimo tudi pri bolnikih z rakom dojke, želodca, pljuč, jeter ali širokega črevesa, vendar se ga v klinični praksi pri teh tipih raka ne uporablja za spremljanje bolnikov (39). Med hormonske tumorske označevalce sodijo še aldosteron in kortizol (tumorji nadledvične žleze), parathormon (rak dojke, rak priželjca), insulin (karcinom endokrinih celic trebušne slinavke), prolaktin (ploščatocelični ali skvamozni karcinomi in adenokarcinomi) in kalcitonin (medularni karcinomi ščitnice) (39). Najpogosteje uporabljani označevalci v klinični onkologiji so zbrani v tabeli 1.

V zadnjih nekaj letih vedno bolj uporabljajo tudi določanje receptorja ravnega faktorja, sorodnega EGFR, HER2/neu, ki je dober napovedni in prognostični označevalac (9). Pojavlja se pri približno četrtini žensk z metastatsko obliko raka dojk. Koristen je predvsem pri odločitvi zdravnikov o načinu zdravljenja bolnic, saj se HER2/neu-pozitivne oblike raka dobro odzivajo na zdravljenje s kemoterapevtikom herceptinom (Trastuzumab®). Običajno ga določajo v tkivih obolelih za rakom. V določenih primerih, na primer pri spremljanju poteka zdravljenja bolnic z rakom dojke, merijo njegovo prisotnost tudi v serumu.

Nove visokozmogljivostne molekularne tehnike kažejo, da bo potrebno pri bolnikih z rakom pregledovati po več tumorskih označevalcev hkrati, saj po desetletjih raziskav na področju raka postaja jasno, da je to heterogena in kompleksna bolezen. Zato verjetno en sam bio-označevalac ne bo nudil dovolj visoke specifičnosti in občutljivosti, temveč bo pri posameznih vrstah raka potrebno določiti po več bio-označevalcev, ki bodo imeli višjo diagnostično in napovedno vrednost (35).

ZAKLJUČEK

Kljub napredku pri kirurškem zdravljenju primarnih neoplazij in razvoju novih, učinkovitejših zdravil, je metastatska bolezen še vedno najpogostejši vzrok smrti bolnikov z rakom. Razlogi za neuspešno zdravljenje metastatskih lezij so:

- v času, ko pri bolniku diagnosticirajo primarni tumor, so zasevki že lahko prisotni v številnih organih,
- zasevki so heterogeni in so lahko odporni proti citostatikom, biološkim zdravilom, hormonski terapiji oziroma proti zdravljenju z radioterapijo in
- zasevki so lahko v organih, kjer zdravila ne dosežejo terapevtskih koncentracij (48).

Poleg tega se za odkrivanje zasevkov uporabljajo metode, ki temeljijo na radiografiji, MRI in CT, ki pa imajo omejeno mejo resolucije (8, 9). Mikrometastaze so običajno majhne in jih s temi metodami ne moremo zaznati. Tudi klasifikacija tumorjev s pomočjo standardiziranih sistemov, ki temeljijo na

lastnostih tumorjev, na primer sistem TNM za klasifikacijo epitelijskih tumorjev, ne poda natančnih ocen o tveganju za napredovanje bolezni (9).

Identifikacija in karakterizacija molekularnih označevalcev, ki so značilni za zasevke posameznih vrst raka, bo omogočila razvoj boljših metod za napovedovanje napredovanja bolezni in tudi razvoj novih terapevtskih strategij (9, 48, 49). Poleg tega je nujno določiti tudi genetske profile heterogenih tumorjev s pomočjo novih genomskih tehnologij, kar bi omogočilo razvoj usmerjenih kombiniranih zdravil, ki bi bila najbolj učinkovita pri uničevanju različnih tumorskih celic (48).

LITERATURA

1. Bast RC, Gansler TS, Holland JF, et al. *Cancer medicine*. 6th ed. Hamilton (ONT), Lewiston (NY): BC Decker; 2000.
2. Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology*. 2007; 39 (3): 305–18.
3. Jacob K, Sollier C, Jabado N. Circulating tumor cells: detection, molecular profiling and future prospects. *Expert Rev Proteomics*. 2007; 4 (6): 741–56.
4. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8 (5): 329–40.
5. Ebert M, Bračko M, Červek J. Rak neznanega izvora. *Onkologija*. 2005; 9 (1): 45–8.
6. Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*. 2006; 12 (8): 895–904.
7. Langley RR, Fidler IJ. Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr Rev*. 2007; 28 (3): 297–321.
8. Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5 (11): 845–56.
9. Zieglschmid V, Hollmann C, Bocher O. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2005; 42 (2): 155–96.
10. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3 (6): 453–8.
11. Glinsky VV, Glinsky GV, Glinskii OV, et al. Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium. *Cancer Res*. 2003; 63 (13): 3805–11.
12. Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett*. 2007; 253 (2): 180–204.
13. Amatangelo MD, Bassi DE, Klein-Szanto AJ, et al. Stroma-derived three-dimensional matrices are necessary and sufficient to promote desmoplastic differentiation of normal fibroblasts. *Am J Pathol*. 2005; 167 (2): 475–88.
14. Beacham DA, Amatangelo MD, Cukierman E. Preparation of extracellular matrices produced by cultured and primary fibroblasts. *Curr Protoc Cell Biol*. 2007; Chapter 10: Unit 10.9.
15. Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst*. 1970; 45 (4): 773–82.
16. Fidler IJ, Nicolson GL. Fate of recirculating B16 melanoma metastatic variant cells in parabiotic syngeneic recipients. *J Natl Cancer Inst*. 1977; 58 (6): 1867–72.
17. Khatib AM, Auguste P, Fallavollita L, et al. Characterization of the host proinflammatory response to tumor cells during the initial stages of liver metastasis. *Am J Pathol*. 2005; 167 (3): 749–59.
18. Khatib AM, Kontogianna M, Fallavollita L, et al. Rapid induction of cytokine and E-selectin expression in the liver in response to metastatic tumor cells. *Cancer Res*. 1999; 59 (6): 1356–61.
19. Brown DM, Ruoslahti E. Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis. *Cancer Cell*. 2004; 5 (4): 365–74.

20. Bockhorn M, Jain RK, Munn LL. Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed? *Lancet Oncol.* 2007; 8 (5): 444-8.
21. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med.* 1995; 1 (2): 149-53.
22. Ribatti D, Mangialardi G, Vacca A. Stephen Paget and the 'seed and soil' theory of metastatic dissemination. *Clin Exp Med.* 2006; 6 (4): 145-9.
23. Leong S, Christopherson RI, Baxter RC. Profiling of apoptotic changes in human breast cancer cells using SELDI-TOF mass spectrometry. *Cell Physiol Biochem.* 2007; 20 (5): 579-90.
24. Weber GF. *Molecular mechanisms of cancer.* Dordrecht: Springer-Verlag GmbH; 2007.
25. Fokas E, Engenhart-Cabillic R, Daniilidis K, et al. Metastasis: the seed and soil theory gains identity. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26 (3-4): 705-15.
26. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature.* 2005; 438 (7069): 820-7.
27. O'Donnell RK, Kupferman M, Wei SJ, et al. Gene expression signature predicts lymphatic metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oncogene.* 2005; 24 (7): 1244-51.
28. Hwang RF, Yokoi K, Bucana CD, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor receptor phosphorylation by STI571 (Gleevec) reduces growth and metastasis of human pancreatic carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Clin Cancer Res.* 2003; 9 (17): 6534-44.
29. Zhang T, Sun HC, Xu Y, et al. Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha in endothelial cells of hepatocellular carcinoma associated with high metastatic potential. *Clin Cancer Res.* 2005; 11 (24 Suppl 1): 8557-63.
30. Zeelenberg IS, Ruuls-Van Stalle L, Roos E. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res.* 2003; 63 (13): 3833-9.
31. Papadimitriou MN, Menter DG, Konstantopoulos K, et al. Integrin alpha4beta1/VCAM-1 pathway mediates primary adhesion of RAW117 lymphoma cells to hepatic sinusoidal endothelial cells under flow. *Clin Exp Metastasis.* 1999; 17 (8): 669-76.
32. Weber GF. *Molecular mechanisms of metastasis.* *Cancer Lett.* 2008; 270 (2): 181-90.
33. Wilmanns C, Fan D, O'Brian CA, et al. Orthotopic and ectopic organ environments differentially influence the sensitivity of murine colon carcinoma cells to doxorubicin and 5-fluorouracil. *Int J Cancer.* 1992; 52 (1): 98-104.
34. Faca V, Krasnoselsky A, Hanash S. Innovative proteomic approaches for cancer biomarker discovery. *Biotechniques.* 2007; 43 (3): 279, 281-3, 285.
35. Hanash SM, Pitteri SJ, Faca VM. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. *Nature.* 2008; 452 (7187): 571-9.
36. Lee BTK, Liew L, Lim J, et al. Candidate List of yoUr Biomarker (CLUB): A Web-based Platform to Aid Cancer Biomarker Research. *Biomarker Insights.* 2008 (3): 65-71.
37. Alaiya A, Al-Mohanna M, Linder S. Clinical cancer proteomics: promises and pitfalls. *J Proteome Res.* 2005; 4 (4): 1213-22.
38. Omenn GS. Strategies for plasma proteomic profiling of cancers. *Proteomics.* 2006; 6 (20): 5662-73.
39. Novakovic S. Tumorski označevalci v klinični onkologiji. *Radiol Oncol.* 2004; 38 (2): 73-83.
40. Polanski M, Anderson NL. A List of Candidate Cancer Biomarkers for Targeted Proteomics. *Biomarker Insights.* 2006 (2): 1-48.
41. Cho WC. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Mol Cancer.* 2007; 6: 25.
42. Chen YR, Juan HF, Huang HC, et al. Quantitative proteomic and genomic profiling reveals metastasis-related protein expression patterns in gastric cancer cells. *J Proteome Res.* 2006; 5 (10): 2727-42.
43. Kumar S, Mohan A, Guleria R. Biomarkers in cancer screening, research and detection: present and future: a review. *Biomarkers.* 2006; 11 (5): 385-405.
44. Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, et al. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93 (14): 1054-61.
45. ACS: American Cancer Society. Tumor Markers [internet]. American Cancer Society; 2010 [citirano 2009 Aug 19]. Dosegljivo na: http://www.cancer.org/docroot/PED/content/PED_2_3X_Tumor_Markers.asp?sitearea=PED
46. Koepke JA. Molecular marker test standardization. *Cancer.* 1992; 69 (6 Suppl): 1578-81.
47. Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, et al. *Clinical oncology.* 3rd ed. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone; 2004.
48. Kaiser HE, Nasir A, Nasir NA. Selected aspects of cancer progression: metastasis, apoptosis and immune response. Dordrecht: Springer; 2008.
49. Kufe DW, Holland JF, Frei E, et al. *Cancer medicine.* 6th ed. Hamilton (ONT), Lewiston (NY): BC Decker; 2003.