

Alfa-fetoprotein

- historie a význam jeho objevu (3. část)

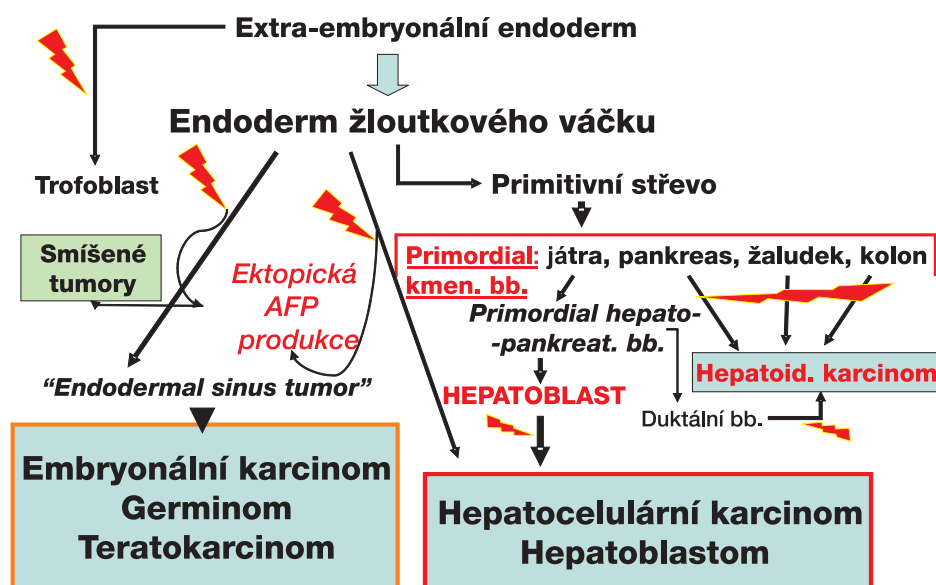
3. Patologie AFP

Patologická resyntéza AFP po narození byla prokázána už v počátečním období jeho výzkumu a byla hlavním důvodem pro rozšíření bádání v této problematice po celém světě. Už tehdy se ukázalo, že výrazněji zvýšená koncentrace AFP je nalézána u tří typů nádorových onemocnění: primárních nádorů jater (hepatoblastomů a hepatocelulárních karcinomů), embryonálních karcinomů (teratokarcinomů) a vzácně u některých karcinomů pankreatu, žaludku nebo střeva. Po histologické stránce fetoprotein-pozitivní byly ty nádory, které derivovaly z buněk (tkáni), které v ontogeneze byly místem fyziologické syntézy AFP tj. embryonální a fetální hepatoblast, buňky žloutkového vřetku (entodermální sinus) a buňky primitivního střeva. Naproti tomu jiné formy embryonálních tumorů jako je dysgerminom, nefroblastom, zralý teratom a rhabdomyosarkom, podobně i ostatní nádory, byly fetoprotein-negativní. Frekvence fetoprotein-pozitivních nádorů je však rozdílná. Zatímco u hepatoblastomů byl nález zvýšené tvorby AFP > 75 %, u hepatocelulárního karcinomu to kolísalo podle různých autorů kolem 65 % i méně (54 %), u teratokarcinomů kolem 35 - 50 %, u nádorů pankreatu a GIT kolem 1 - 3 %. Souviselo to s histologickým nálezem nádorové tkáně respektive s přítomností (a s procentuálním zastoupením) maligně transformovaných buněk derivujících z AFP-pozitivních prekurzorů. Je také možné, že část pacientů s karcinomy z buněk derivujících od prekurzorů fyziologicky syntetizujících AFP, ale bez jeho zvýšení v krevní cirkulaci, patří do skupiny nádorů AFP-nesecernujících nebo syntetizujících vari-

anty AFP s epitopy neprokazatelnými běžnými anti-AFP-immunními séry (obr. 1).

ly, „low-grade“ a „high-grade dysplastic nodules“) ústící v konečné fázi do tkáně

GENEZE AFP produkujících tumorů



Obr. 1: Geneze AFP produktivních nádorů

Hepatocelulární karcinom

Jde o heterogenní skupinu maligních nádorů, které derivují z jaterních buněk v různém stádiu diferenciaci a mají různé biologické chování a různý klinický dopad. U těchto nádorů se předpokládalo, že fetoprotein-negativní jsou hepatocelulární karcinomy složené převážně z velmi málo diferencovaných buněk (tzv. *anaplastický hepatom*) nebo naopak z buněk vysoce diferencovaných (*zralý hepatom*). Rovněž **cholangiokarcinomy** (hepatobiliární nádory derivující z duktálních buněk) byly v našem souboru AFP-negativní. V současné době se předpokládá, že HCC vzniká postupnou přeměnou cirhotické jaterní tkáně na dysplastické noduly (různého stupně dysplázie: regenerační nodu-

nádorové. U „high-grade dysplastic nodules“ byly prokázány delece chromosomu 8p a zisk 1q. Velké prospektivní studie hodnotící diagnostickou validitu AFP pro HCC konstatují, že senzitivita testu kolísá od 39 % do 64 %, specifita 76 - 91 % a pozitivní prediktivní hodnota 9 % - 32 %. Jiná studie prokazuje, že hladina AFP > 200 g/l u pacientů s HCV-asociovanou cirhózou a nádorovými ložisky v játrech svědčí s vysokou pravděpodobností pro HCC. Vzácně (asi 1 %) je pozorována **kombinace HCC a cholangiokarcinomu**; viz případ pacienta s kombinací cholangiokarcinomu a struktur hepatomu, v jehož krvi bylo nalezeno též zvýšení AFP. Jiní autoři klasifikují pacienty s HCC do dvou velkých skupin: (a) hepatocelu-

lární a (b) biliární linie. Klasifikace je založena na imunohistochemické detekci hepatocelulárních diferenciacních znaků (HEP-PAR-reactive antigen), biliárních diferenciacních znaků (AE1-AE3, cytokeratin-19) a proliferacních markerů (Ki-67, proliferating cell nuclear antigen) a také na přítomnosti AFP, p53 a TGF α . Hepatocelulární diferenciacní markery byly detekovány u 99,7 % pacientů s HCC (tato skupina měla delší přežití), na rozdíl od nádorů obsahujících též biliární diferenciacní znaky (29,3 %), jejichž průběh byl více agresivní. Dále byla ještě definována fibrolamelární varianta hepatocelulárního karcinomu, u níž jsou zvýšeny především faktory produkované extracelulární matrix (kupř. aktivní matrix-metaloproteináza 2) nikoliv AFP (AFP je pozitivní jen asi u 5 %). Tato varianta HCC se též liší od běžného HCC lepší prognózou po resekci tumoru a po chemoterapii. Byla též popsána spontánní regrese HCC po resekci u pacientky s vysokou preoperační hladinou AFP-L3, což bylo přičítáno nedostatečnému krevnímu zásobení nádoru pro nevyvinutí lokálního arteriálního řečiště. Výsledky nedávné velké studie, zahrnující skupinu 1158 pacientů, potvrdily relativně nízkou senzitivitu (54 %) stanovení AFP v séru pro diagnostiku. Srovnávací ultrastrukturální a imunohistochemické studie ukázaly rozdíly v expresi AFP a Tn-proteinu (Thomsen-Friedenreich-related antigen) v nádorové tkáni: Intenzita exprese a pozitivita Tn-proteinu byla u pacientů HCC-AFP negativních výrazněji a prognóza onemocnění příznivější než u pacientů HCC-AFP pozitivních, kde zvýšení AFP korelovalo pozitivně s horší prognózou. Také frekvence pozitivity vaskulárního endotelového růstového faktoru C (VEGF C) byla u pacientů s nádorem žaludku metastazujícím do jater AFP pozitivním výrazněji a mortalita vyšší než u pacientů s nádorem AFP negativním. Genetickou diverzitu prokazují v letošním roce publikovaným sdělením *Boyalto* a spolupracovníci. Na základě transkriptom-genotyp-fenotypové analýzy (vyšetření 16 diagnostických genů) 57 hepatocelulárních karcinomů a 3 hepatálních adenomů u 123 pacientů mohli identifikovat 6 velkých podskupin (G1 až G6) lišících se v klinické a genetické charakteristice. Tato nová klasifikace umožňuje správnou volbu pro jednotlivé podtypy HCC,

protože 50 % nádorů vzniká patologickou aktivací dráhy WNT nebo AKT, jejichž komponenty mohou být potenciálním cílem specifické protinádorové terapie.

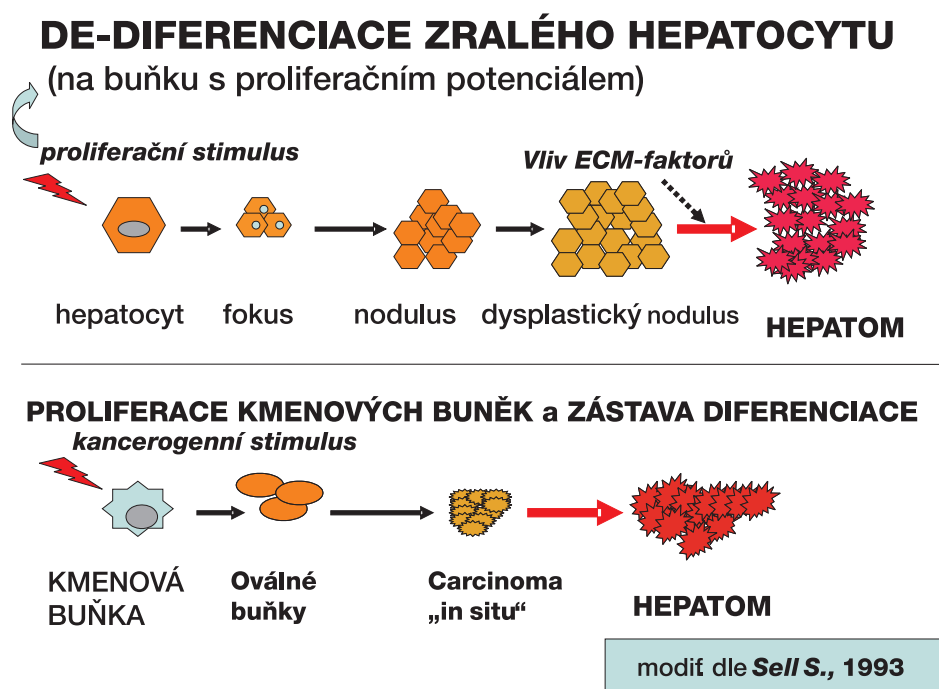
Hepatoblastom a hepatocelulární karcinom v dětském věku se liší jak ve výskytu vzhledem k věku, tak v pozitivitě HBsAg, v tendenci k rupturám jater, v chemosenzitivitě a v prognóze. Na etiopatogenezi hepatoblastomu u novorozenců s nízkou porodní hmotností se podílí oxidační poškození DNA prokázané imunohistochemicky přítomností 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu. Průkaz této látky je projevem opravného mechanismu DNA a není specifický jen pro hepatoblastom. Naproti tomu vysoká exprese PLK1 onkogenu byla nalezena především u hepatoblastomů vyznačujících se špatnou prognózou. Tateishi doporučuje pro včasné odhalení event. recurence HCC po léčebné ablaci nádoru sledovat tři markery: AFP, AFP-L3 a DCP.

AFP a hepatokancerogeneze

Už v 70. letech se obnovení výrazně zvýšené syntézy v nádorových buňkách hepatocelulárního karcinomu dávalo do spojení s teoriemi o vzniku nádorového bujení. Vycházelo se z předpokladu, že maligní transformaci, která vede k rozvoji nádorového onemocnění, mohou podléhat jen buňky schopné proliferace respektive schopné reagovat na růstové stimuly (mi-

totický potenciál). Jde především o kmenové buňky vyskytující se v tkáních schopných regenerace, u nichž po nádorové proliferaci došlo k zástavě diferenciacce (maturation arrest) nebo o buňky v určitém stupni diferenciacce, u nichž došlo k dediferenciaci nebo k retrodiferenciaci a k expresi genů navozujících proliferaci. Debata o těchto dvou hlavních teoriích hepatokancerogeneze pokračuje dodnes. Dlouhodobě se touto problematikou zabývá pracovní skupina vedená Sellem (obr. 2).

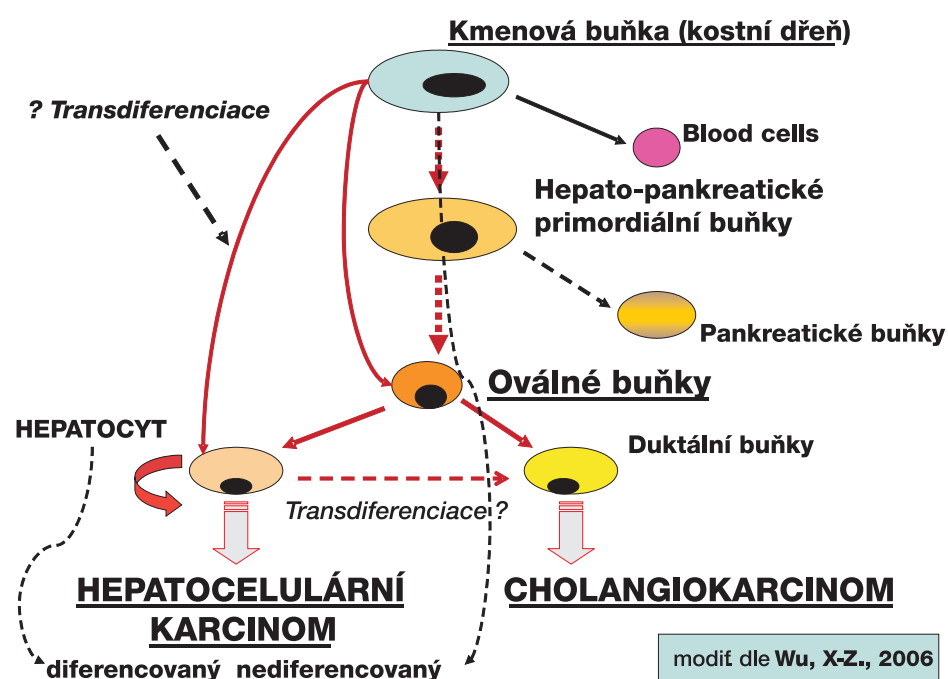
Abelev přikládá důležitou roli pro vznik a progresi tumoru mezibuněčné komunikaci a interakci buněk s komponenty extracelulární matrix (dearrangement of microenvironment), kdy může dojít k parciální nebo i úplné dediferenciaci hepatocytů. Výsledky experimentálních prací Kuhlmann a Peshkeho svědčí pro vznik hepatocelulárního karcinomu jednak z oválných buněk navožením nádorové proliferace a diferenciacce, jednak z alterovaných (dediferencovaných) zralých hepatocytů; oba druhy buněk si zachovávají vlastnosti podobné kmenovým buňkám. Pro reakci fetálních genů svědčí nárůst syntézy AFP. Jiní autoři soudí, že hepatocelulární karcinom se také může odvíjet transdiferenciací buněk kostní dřevě. Jako cílové buňky maligní transformace přichází v úvahu více než jeden typ buněk. Tuto teorii podporuje zjištění, že chudě diferen-



Obr. 2: Dvě cesty hepatokancerogeneze

cované formy HCC pocházejí z kmenových buněk kostní dřeně, kdežto dobře diferencované ze zralých hepatocytů. Obě skupiny, tj. kmenové buňky kostní dřeně i maligní kmenové buňky, diferencují na hepatocyty v pokusech *in vitro* a *in vivo*. Klíčovým faktorem této přeměny je pravděpodobně zatím nevyjasněný mechanismus diferenačního bloku, transdiference nebo buněčné fúze. Hepatokancerogeneze se tedy může odvíjet od čtyř typů linie jaterních buněk:

(1) kmenová buňka kostní dřeně, (2) kmenová buňka hepato-pankreatická, (3) oválná buňka a (4) hepatocyt. Schéma základní diference a transformace na HCC nebo cholangiokarcinom shrnuje obrázek 3.



Obr. 3: Schéma diference primordiálních buněk v hepatobiliární oblasti

Kmenové buňky kostní dřeně mohou diferencovat v buňky oválné, které pak mohou dále diferencovat na hepatocyty nebo na buňky duktální. Některé experimenty prokazují, že zralé hepatocyty mohou také *transdiferencovat* na buňky duktální. Vývoj pankreatického a jaterního hrbolku v průběhu embryogeneze nasvědčuje tomu, že existuje společná progenitorová buňka pro pankreas i pro játra. Všechny čtyři typy buněk popisované linie mohou být teoreticky cílem hepatokancerogeneze. Jinými slovy řečeno, hepatocelulární karcinom může vzniknout maligní transformací buněk linie jaterní kmenové buňky v různém stádiu diference. Fetoprotein-produktivní HCC jsou jen ty hepatomy, které se dostaly do stádia dife-

renciace charakterizované syntézou AFP v průběhu ontogeneze, což jsou embryonální a fetální hepatocyty (hepatoblasty).

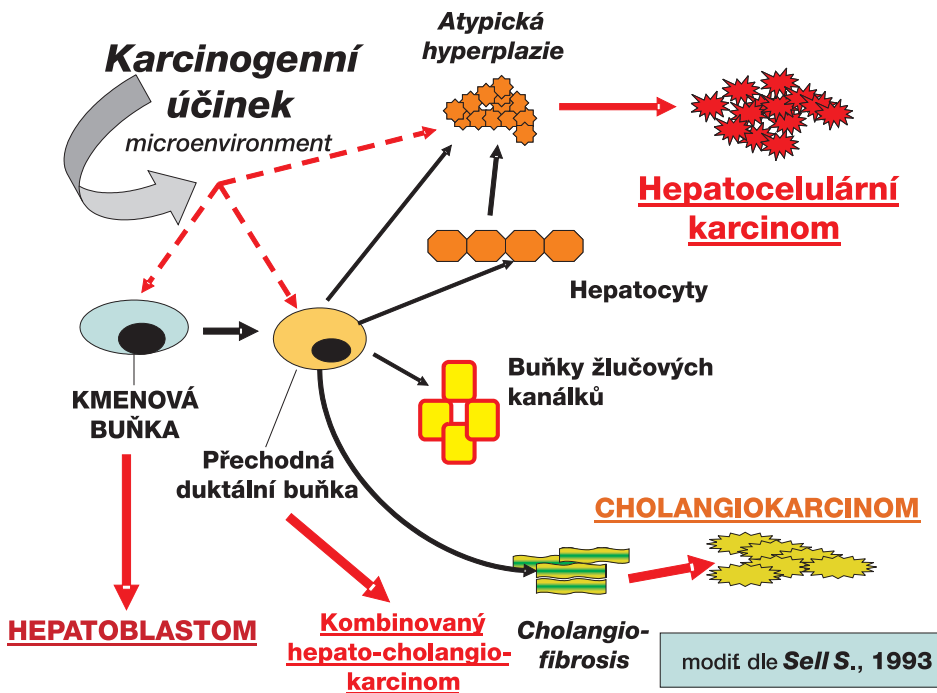
K vlastní hypotéze o hepatokancerogenezi je možno ještě říci toto: Játra se odlišují od ostatních orgánů tím, že mají významnou funkci detoxikační, na poškození reagují regeneračními mechanismy a hepatocyty jsou rezistentní vůči apoptóze. Játra jsou obranným orgánem, který odpovídá na poškození jedinečným způsobem. Non-hepatocyty proliferují buněčným cyklem dělení, dokud nejsou natolik poškozeny, že odumřou nebo naopak jejich poškození podnítlí reparační pochody; na protu hepatocyty, u nichž je cyklus dělení v klidové fázi (G₀), reagují na po-

něk (*stem cell self-renewal*). Cílovými buňkami tohoto patologického procesu může být kterýkoli výše uvedený typ „linie jaterních kmenových buněk“ (*hepatic stem cell lineage*). Významný je i vliv lokální extracelulární matrix (ECM), která určuje a udržuje diferencovaný fenotyp jaterních buněk regulačním účinkem na hepatální geny a jaterní transkripční faktory. Potlačení aktivity **KLF-6** je časný projev hepatokancerogeneze, dochází přitom k proliferaci a k zástavě diference (obr. 4).

Různé geny podílející se na patogenezi HCC možno rozdělit do čtyř větších skupin: (1) *Geny regulující odpověď na poškození DNA (P53-dráha: p53)*; (2) *Geny podílející se na kontrole buněčného cyklu dělení (retinoblastomová dráha: RB1, p16INK4A, cyklin D)*; (3) *Geny účastnící se inhibice růstu nebo apoptózy (dráha transformačního faktoru beta = TGFβ: mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor, proteiny SMAD2, SMAD4)*; (4) *Geny odpovědné za buněčnou interakci a signální transdukcii (dráha APC/β-katenin: β-katenin, E-kadherin)*. Hepatokancerogeneze může být navozena ztrátou heterozygosity, somatickou mutací, „*de novo*“ methylací nebo funkcionální inaktivací.

Fokální nodulární hyperplazie jaterních buněk se nepovažuje za preneoplastický stav (AFP obvykle nezvýšen); jde spíše o koincidenci respektive o epifenomen spojený s abnormální dodávkou krve pramenící z nádorové vaskulatury. Kandidátními geny, které predikují (až v 95 %) přítomnost HCC, jsou (zatím) následující: **LYVE 1, E-kadherin survivin**. Nalezené genomové aberace u HCC se týkají především chromosomů 1q, 5, 12 a 19q (zisk) a dále chromosomů 4p, 7q22-q35, 9p, 17p, 21q a 22q. *Fetoprotein-transkripční faktor (FTF)* je „orphan“ nukleární receptor, který aktivuje AFP-gen v časně embryonální fázi vývoje jaterní tkáně. Z experimentů (na myších) se předpokládá, že FTF už v počátku ontogeneze je spojovacím článkem mezi entodermálními specifikačními signály a geny, které vytvářejí a zmnožují hepatální fenotyp.

V experimentech s buněčnou kulturou NIH 3T3 cells, na jejichž povrchu byl prokázán receptor pro AFP, po vazbě s přídavným AFP dochází k aktivaci signální dráhy PKA, (proteinkináza A), zvýšení



Obr. 4: Schéma maligní transformace a diferenciace AFP produktivních (ev. AFP neproduktivních) tumorů v hepatobiliární oblasti

cAMP s následnou expresí K-ras p21 genu, což vede k proliferaci buněk této linie.

Germinomy a embryonální karcinomy (teratokarcinomy)

U nádorů ze zárodečných buněk (**germ cell tumors**), což je skupina velmi heterogenní, jsou AFP-pozitivní nádory žloutkového váčku (**yolk sac tumors**, resp. endodermal sinus tumors sec. *Teilm*), kde procento pozitivita přesahuje 95 %, a dále **embryonální karcinomy**, u nichž pozitivita AFP je podmíněna přítomností buněčných struktur žloutkového váčku. Zvýšení AFP se může objevit též u **tumorů smíšených**, kde je větší nebo menší přítomnost buněk žloutkového váčku. Dalším diagnostickým markerem germinomů je **β-hCG** (choriogonadotropin), který je produkován v nádoru obsahujícím struktury **trofoblastu**. Pro germinomy je přítomnost alespoň jednoho z těchto markerů (AFP, β-hCG) příznačná. Zvýšení jen hCG mívá horší prognózu. O významu laboratorních markerů (především AFP, hCG a laktátdehydrogenázy - LD1) pro diagnostiku a sledování nádorů ze zárodečných buněk referuje *von Eyben*. Velmi zajímavý je nález **současného výskytu nádoru varlete ze Sertoliho buněk a hepatocelulárního karcinomu** s enormně vysokou hladinou AFP u 21-letého muže. Extrémně vysoké hodnoty AFP u novorozence s benigním

intraperikardiálním teratodem nalezl *Meuris*. Jde o velmi ojedinělé případy, u nichž je pozitivita způsobena příměsí maligních buněk derivujících od buněk produkujících AFP.

Teratokarcinogeneze
Teratokarcinomy obsahují buňky nediferencované i plně diferencované. Vznikají proto nejspíše **maligní transformací embryonálních kmenových buněk** (maligních presomatických buněk), které s vývojem organogeneze mohou postupně diferencovat za vzniku **tkáňových kmenových buněk** (tzv. **kmenové buňky determinované**), schopné proliferovat a vytvořit orgán (event. jeho rudiment) nebo příslušnou buněčnou linii s dvojným charakterem dceřinných buněk, jedny proliferující (zachovávající si mitotický potenciál), druhé se schopností diferenciace do určitého stádia, event. až do stádia buňky terminálně diferencované. **Vznikají tak maligní teratokarcinomy až benigní teratomy.**

AFP u jiných nádorových onemocnění

Patologické zvýšení AFP po narození se objevuje ojediněle též u jiných nádorů jako jsou **nádory pankreatu, žaludku nebo střeva**. *Shinagawa* popsal případ 30-leté ženy s karcinomem hlavy pankreatu z acinárních buněk s pestrá diferenciací (multi-directional differentiation). Nádor produkoval nejen AFP, lipázu, trypsin, ale

též malé množství CEA, CA 19-9, NSE a synaptophysin. Hovoří se někdy o **ektopické tvorbě AFP**. O možném nálezu zvýšeného AFP u karcinomů trávicího ústrojí s metastázami do jater referuje *Nishioka*. Byly popsány zvláštní **agresivní formy adenokarcinomu žaludku** produkující AFP z histologicky i geneticky odlišných ložisek. Dalším případem je **hepatoidní adenokarcinom žaludku (gastric hepatoid adenocarcinoma)** popisovaný jako zvláštní klinická jednotka. Pravděpodobně do podobné kategorie patří i případ preoperativně diagnostikovaný jako „**pure gastric yolk sac tumor**“ v kardii žaludku. Dále byly objeveny případy **intrahepatálních cholangiokarcinomů** se zvýšenými hodnotami AFP a naopak s relativně nízkou hladinou CA 19-9, který je jinak pro cholangiokarcinomy typický. Případ 79-leté ženy a **cholangiokarcinom „clear cell type“** s koncentrací AFP 2265 µg/l popisují *Miyazawa* a spol. Velmi zajímavý je dále nález **mesenchymálního hamartomu jater** nejprve nesprávně klinicky i radiologicky diagnostikovaný jako hepatoblastom. Abundantní a poněkud atypické formy hepatocytů produkujících AFP byly nalezeny na okraji nádoru. Také u **kojeneckého hemangioendotheliomu jater** může být vzácně nalezeno výraznější zvýšení AFP. Rovněž zvláštní je případ **solitárních endobronchiálních metastáz hepatocelulárního karcinomu** u 80-letého muže. Jako extrémně vzácný byl popsán případ 71-letého muže s **kolorektálním karcinomem** a neobvykle bohatými **metastázami do lymfatických uzlin** provázený **zvýšenou tvorbou AFP**. AFP byl také prokázán v nádorové tkáni **sialoblastomu** (vzácně se vyskytující kongenitální nebo perinatální tumor slinných žláz), dále u **adenokarcinomu tlustého střeva** označovaného jako „**hepatoid carcinoma**“ s metastázami do jater a špatnou prognózou nebo u **hepatoidního karcinomu** vyskytujícího se u **nádorů ledvin**. Neobvyklým nálezem je AFP-produkující **papilární serózní karcinom dělohy** u 44-leté ženy, který metastazoval do vaječníků. V oblasti dělohy jsou častější AFP-pozitivní nádory patřící do skupiny **maligních smíšených muellerianských tumorů, hepatoidních karcinomů nádorů žloutkového váčku**. Velmi vzácné jsou případy **pankreatoblastomů** nebo **karcinomů pankreatu kojenců** (infantile pancreatic carcinoma),

u nichž dochází ke zvýšení AFP až u 68 % nemocných. Nevysvětlený je případ 62-letého muže s **karcinomem sběrných kanálků ledvin** se zvýšenou hladinou AFP. Podobně je tomu u nálezu AFP u karcinomu z přechodných buněk (transitional cell carcinoma) v ledvině pánvičce. Byl též popsán **AFP-produkující serózní karcinom dělohy** metastazující do ovarií, napodobující tak nádor ze žlutkového vřáčku. Byl také popsán případ **AFP-produkujícího karcinomu tlustého střeva** s atypicky velkými metastázami do okolních lymfatických uzlin bez známek hematogenního rozsevu.

U velké většiny jiných nádorů (karcinomů, sarkomů, hemoblastóz), stejně jako u jiných nádorů embryonálního původu, jako jsou **dysgerminomy, zralé teratomy, nefroblastomy, neuroblastomy, sympatoblastomy, „čistě“ seminomy nebo choriokarcinomy**, tedy nádory, které neobsahují struktury (maligně transformované buňky) odvozené od linie hepatoblastů nebo entodermálního sinu, zvýšená hladina AFP („de novo“ produkce) nebyla nalezena. Také metastázy jiných nádorů do jater jsou AFP-negativní, až na výjimky, kdy pravděpodobně dochází k aktivaci (transdiferenciaci) hepatocytů sousedících s metastázou.

Zvýšení AFP u nenádorových onemocnění

Zvýšená hladina AFP nad horní fyziologickou hranici byla popsána pouze v následujících klinických situacích: (a) **novorozenecké a kojenecké nenádorové hepatopatie** (především virové hepatitidy, některé případy biliární atrezie); (b) **hereditární tyrosinosis Typ I; ataxia telean-giectasia, Indian childhood cirrhosis, cystic fibrosis**; (c) **jaterní cirhóza a chronické hepatitidy** (jen mírné zvýšení u části případů); (d) **jako známka regenerační aktivity jater**.

Domníváme se, že zvýšení tvorby AFP při poškození jaterního parenchymu je způsobeno reparačními mechanismy, jejichž součástí je obnova poškozené tkáně aktivací určitých progenitorových buněk (kupř. buněk kostní dřeně). Stimulaci exprese mRNA_{AFP} s následnou zvýšenou tvorbou AFP navozuje aktivace jaterního růstového faktoru (HGF). Zvýšení AFP v plasmě krátce (vzestup 2,2-krát mezi 1. a 3. dnem) při náhlém selhání jaterních

funkcí (acute liver failure) je dobrým prognostickým znamením (spontánní přežití v 71 % případů).

Non-hepatomová pozitivita AFP vysvětluje, proč specifita stanovení AFP u hepatocelulárního karcinomu není dostatečná (kolem 65 %). Na druhé straně je dost velké procento pacientů s **hepatocelulárním karcinomem ale AFP-negativní**. Jsou proto hledány **další testy**, které by pomohly **odhalit HCC v časném stádiu**, nebo které mají z různých důvodů nedetekovatelnou patologickou hladinu AFP běžným vyšetřením. Patří mezi ně **glypican-3** (na membránu vázaný heparan-sulfátový proteoglykan), který je exprimován určitými strukturami hepatocelulárního karcinomu, ale je nedetekovatelný v normálních hepatocytech nebo u nemaligních hepatopatií, dále to je **α -L-fukosidáza (AFU)**, lysozomální enzym zvýšený v séru pacientů s jaterní cirhózou sdruženou s hepatocelulárním karcinomem. Kombinace tří markerů **AFP + AFU + VEGF** (růstový faktor vaskulárního endotelu) se zdá mít pro včasnou diagnózu HCC (už ve stádiu I) vysokou senzitivitu. Vyšetření **8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu** jako markeru oxidačního poškození DNA v hepatocytech je sdruženo s nekrotizujícím zánětem a je prediktorem vysoké malignity (high-grade malignity) HCC, provázené výraznějším zvýšením AFP. Z dalších nových markerů je to **KL-6**, zvýšení nad 500 U/l spolu se zvýšením **PIVKA-II** (Protein Induced Vitamin K deficiency) zvyšuje pravděpodobnost diagnózy HCC na 99 %. Také zvýšená plasmatická hladina **nociceptin/orphaninu FQ** (což je endogenní agonista „opioid“ receptor-like 1 receptoru) byla náhodně nalezena u pacientů s HCC. Z dřívějších markerů doporučených pro zlepšení diagnostiky HCC v kombinaci s AFP je kromě **AFP-L3** (Lens culinaris agglutinin-reactive fraction of AFP) též monosialyovaný AFP (**ms-AFP**) a prekursor normálního protrombinu **des-gamma-carboxyprothrombin (DCP, také PIVKA-II)**. Do screeningové strategie pro HCC někteří autoři navrhuji jako markery kromě **AFP, AFP-L3, DCP, glypican-3 (GPC3)**, též **human hepatocyte growth factor, insulin-like growth factor-2** a k tomu techniky jako „gene-expressing microarray“ nebo kompletní proteomická analýza. Na výhodu kombinace stanovení AFP spolu s **antigenem z dlaždicových**

buněk (SCCA) upozorňuje *Giannelli*. Na výhodnost stanovení **AFP specifického pro hepatom (HS-AFP)** kombinovaného se stanovením mRNA-AFP v cirkulující krvi pro senzitivnější a specifitější diagnózu a monitorování hepatocelulárního karcinomu upozorňuje Wu a spol. Pro staging hepatocelulárního karcinomu se doporučuje nový **skórovací systém**, založený na vyšetření sérových markerů: **bilirubin, albumin, AFP-L3, AFP a DCP** (zkratka **BALAD**). Určení **rychlosti progresu** (zvyšování hladiny) AFP pomáhá rozlišit pacienty s HCC od nenádorové cirhózy; zvýšení $\geq 7 \mu\text{g/l}$ za 1 měsíc svědčí spíše pro HCC (senzitivita 71,4 %, specifita 100 %). HCC je heterogenní skupina tumorů s rozdílnými rizikovými faktory a genetickými alteracemi (ztráta heterozygotity, genové mutace, promotorová methylace **CDH1, CDKN2A** a počet **HBV-DNA kopií**). Na základě analýzy transkriptomu byla navržena **klasifikace HCC** do šesti větších skupin (G1 až G6), která by pomohla nalézt specifické cílové molekuly pro nejjvhodnější terapii.

Podrobně vysvětlují charakteristiku a význam různých markerů pro diagnostiku a určování prognózy hepatocelulárního karcinomu v minireferátu čínští autoři; v Číně je HCC nejčtenějším maligním tumorem a je na druhém místě žebříčku mortality. Uvádějí, že dosavadní rozhodovací koncentrace **AFP** (zdravý/nemocný) 20 ng/ml se doporučuje zvýšit na hodnotu 30 ng/ml; výsledná senzitivita a specifita je rozdílná u různých etnických skupin. Nález vysokých hodnot svědčí pro horší prognózu. Může to být způsobeno (částečně) zvýšenou expresí ephrinu A1, který indukuje expresi genů podílejících se na buněčném cyklu (p21), angiogenezi (angiopoietin 1, thrombospondin 1), interakci buňka-buňka (Rho, integrin, matrix-metalloproteinázy), tedy genů podporujících růst tumorových buněk, angiogenezi, invazi a metastázy. Účast na tom má též vlastní účinek molekuly AFP, jehož produkcí se nádor snaží uniknout imunologickému dohledu (immunological surveillance) hostitelských lymfocytů. **Vyšetření glykoforem AFP (AFP-L1, -L2, -L3)** zpřesňuje diferenciální diagnostiku: AFP-L1 (LCA non-bound fraction) je hlavní glykoformou non-maligních hepatopatií, kdežto AFP-L3 (LCA-bound fraction) se nalézá více u pacientů s HCC (cut-off po-

dílu = 15 %). Vyšší podíl ukazuje na horší prognózu (tumor větší než 3 cm, jeho zásobení z arteria hepatica nebo invaze do vena portae). **Des-gamma-carboxy-prothrombin (DCP)** neboli **PIVKA-II** (produkt nedostatečné karboxylace při tvorbě protrombinu) působí jako autologní mitogen pro HCC. Jeho koncentrace v séru nekoreluje s AFP. Vyšetření v séru a v tkáni může odlišit maligní od non-maligních hepatopatií. Hodnota cut-off rozlišující jaterní cirhózu od HCC se uvádí 40 mAU/ml (senzitivita-51,7 %, specifita-86,7 %); při cut-off 125 mAU/ml pro rozlišení HCC a non-hepatopatie to je 89 % a 86,7 %. Společné vyšetření hsDCP (high-sensitive DCP), AFP a AFP-L3 zvyšuje diskriminační validitu testu. **Glypican-3 (GPC3)** je heparansulfát-proteoglykan zakotvený na plasmatické membráně. Váže se s některými růstovými faktory a moduluje jejich aktivitu. Expres GPC3 (mRNA i protein) je signifikantně vyšší v séru pacientů s HCC než u zdravých jedinců ($p < 0,001$) nebo pacientů s non-hepatopatiemi ($p < 0,01$). Společné vyšetření GPC3 a AFP zvyšuje diskriminační schopnost testu z 50 % na 72 %. Také mRNA-GPC3 je signifikantně více exprimován (upregulated) v tkáni HCC ve srovnání s paraneoplastickou nebo zdravou jaterní tkání. **Gamma-glutamyltransferáza (GGT)** je tvořena u zdravých jedinců Kupfferovými buňkami a epitelem žlučovýchodů; její katalytická koncentrace značně vzrůstá v tkáni HCC a ve fetálních játrech. Celkovou GGT možno rozdělit na řadu isoenzymů pomocí polyakrylamidové gradientové gelové elektroforézy. Pro HCC je specifická skupina isoforem GGT II. Senzitivita detekce je pro HCC 74 %, pro malý HCC 43,8 %. **Alpha-fukosidáza (AFU)** je enzym, který hydrolyzuje glykosidickou α -fukosylovou vazbu v glykoproteinech a glykolipidech. Aktivita v séru pacientů s HCC činí $1418,62 \pm 575,76$ nmol/ml/hod, u zdravých jedinců $504,18 \pm 121,88$, u pacientů s cirhózou $831,25 \pm 261,3$ a s chronickou hepatitidou $717,71 \pm 205,86$. Při hodnotě cut-off 870 nmol/ml/hod je senzitivita 81,7 % a specifita 70,7 %, zatímco pro AFP při cut-off 400 ng/ml je to 39,1 %, resp. 99,3 %. Simultánní vyšetření obou markerů zvyšuje senzitivitu detekce HCC na 82,6 %. Zvýšili se AFU u cirhózy nad 700 nmol/ml/h, tak se v 85 % případů prokáže HCC za šest měsíců už i ultrasonograficky. Nález i ma-

lého množství nádorových buněk v krevní cirkulaci prokazovaný na základě přítomnosti mRNA nádorových markerů jako je **AFP-mRNA**, **GMT-mRNA** nebo **MAGE-1-mRNA** při srovnání pre- a postoperačních hodnot, může odhalit návrat nádorové choroby. **Human telomerase reverse transcriptase mRNA (hTERT-mRNA)** je dalším novým markerem pro detekci HCC (senzitivita 88,2 %, specifita 70,0 %) za použití kvantitativní RT-PCR v reálném čase. Vysoké hodnoty svědčí pro špatnou prognózu. Do stejné kategorie, tj. do skupiny markerů vyšetřovaných pomocí technik molekulové biologie, patří též produkt tumor-supresorového genu **protein p53** (v séru nebo jaterní tkáni) nebo vzniklé cirkulující protilátky **anti-p53**, jejichž detekce je známkou horší prognózy a kratší doby přežití, dále pak **MAGE-1 a 3 (Melanoma antigen gene)** predikující přítomnost metastáz event. rekurenci nádorové choroby nebo **HCCR (Human cervical cell oncogene)**, jehož zvýšení nad 15 $\mu\text{g/l}$ pomáhá odhalit případy HCC seronegativní pro AFP (senzitivita 78,2 % a specifita 95,7 %). Další skupinou pomocných markerů jsou některé **cytokiny** nebo **růstové faktory**. Je to zejména **růstový faktor pro vaskulární endotel - VEGF**, který navozuje tumorovou neovaskularizaci, což je nezbytné pro rozvoj nádorů. Tumorový VEGF přenáší krevní destičky, proto jeho exprese se hodnotí ve vztahu k jejich počtu v krvi. Hodnota $> 1,4 \text{ pg} / 10^6$ svědčí pro pokročilý HCC, trombózu portální žíly, špatnou terapeutickou odpověď a kratší dobu přežití. **Interleukin-8 (IL-8)** je multifunkční CXC chemokin, který ovlivňuje funkci neutrofilů, včetně uvolňování enzymů a expresi povrchových adhezních molekul. Má přímý účinek na tumorovou i vaskulární proliferaci, angiogenezi a migraci nádorových buněk. Sérová hodnota IL-8 činí u pacientů s HCC 17,6 pg/ml, na rozdíl od zdravých jedinců - 1,0 pg/ml. **Transformující růstový faktor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)**, který negativně reguluje růst buněk, je vhodným doplňkovým markerem pro diagnostiku HCC. Hodnoty $> 800 \text{ pg/ml}$ svědčí spíše pro non-maligní hepatopatii. **Tumor-specifický růstový faktor (TSGF)**, který vzniká při amplifikaci krevní kapilární sítě kolem nádoru, proniká do periferní cirkulace ve stádiu proliferace nádorové choroby. Jeho detekce v séru potvrzuje přítomnost nádoru; simultánní stanovení

s jinými markery zvyšuje senzitivitu detekce HCC; cut-off hodnota pro TSGF je 62 U/ml. Podobný význam má i stanovení **IGF-2 (Insulin-like growth factor-2)** při cut-off 50 ng/ml nebo nadměrná exprese **GEP (Granulin-epithelin precursor)** v nádorové tkáni.

Vrozený deficit AFP a vrozená perzistence AFP

Vrozený deficit některého proteinu bývá někdy označován za „hříčku přírody“, která může pomoci objasnit význam tohoto proteinu respektive jeho biologickou funkci. Na rozdíl od případů analbuminémie, atransferinémie apod. je situace u fetoproteinu jiná. Maximum jeho koncentrace se počítá kolem 14. týdne po oplození vajíčka. Pak následuje rychlý pokles, který pokračuje ještě asi 2 - 3 týdny po porodu, kdy hladina AFP v krvi se blíží horní hranici dospělých jedinců, která je o čtyři řády nižší; zbytková syntéza AFP však pokračuje dál a zvyšuje se výrazněji pouze za určitých stavů. Z toho nepřímo vyplývá, že AFP pro vývoj plodu u člověka v druhé polovině těhotenství a později už není nezbytně potřebný. Co by se však dělo, kdyby jeho syntéza byla zablokována už od počátku? Určité vysvětlení přináší publikace Sharonyho, která popisuje dva případy **kongenitálního deficitu AFP** (0,1 - 0,7 ng/ml po porodu) sdruženého s chromosomální abnormitou placenty. Nedetekovatelný AFP ($< 0,5 \text{ ng/ml}$) v plodové vodě, v séru matky a v pupečnickové krvi popsal též Greenberg, F. et al., 1992. Na druhé straně byly už popsány **případy hereditární perzistence zvýšené koncentrace AFP**. Blesa popisuje španělskou rodinu, jejíž devět členů ze sedmnácti mělo trvale výrazně zvýšenou hladinu AFP. Tento stav se vyznačoval autosomálně dominantní dědičností a byl asociován se substitucí G \rightarrow A v pozici -116 „5' flankingů“ regionu AFP-genu.

U myši byla popsána dědičná perzistence AFP způsobená mutací regulačního genu *raf*; naopak defekt jiného regulačního genu - *rif* - navozuje perzistentní snížení syntézy AFP v regenerujících se játrech. Laboratorním modelem pro studium těchto otázek jsou experimenty na *Afp* „knock-out“ myších samic (AFP-KO myš). Tyto myši jsou životaschopné; defekt se projevuje v poruše fertility myších samic a v jejich defeminizaci/maskulinizaci; chy-

bění AFP způsobuje nedostatečné vyvá-
zání estrogenu (výrazné snížení estrogen-
vazebné kapacity = anti-estrogenní akti-
vita).

4. Budoucnost AFP

Tak to byla minulost AFP, dávná i nedáv-
ná. Ale jak to bude dál, má důkladnější
studium o tomto proteinu budoucnost?
Domníváme se, že ano. Řada otázek neby-
la ještě dostatečně zodpovězena nebo do-
řešena a s novými objevy přicházejí další
otazníky i možnosti. Rozluštění lidského
genomu otevřelo cestu k hlubšímu pozná-
vání; nabízí se především **funkční proteo-
mika**, kde podrobný *výzkum struktury
alfa-fetoproteinu (jeho isoforem, gene-
tických a konformačních variant, pepti-
dových fragmentů apod.) ve vztahu k bio-
logickým funkcím může být modelovým
příkladem* pro studium dalších proteinů.

Otázky praktické:

* Včasně rozpoznání reziduální nádorové
choroby detekcí nádorových buněk uvol-
ňovaných do krevní cirkulace (vyšetření
cirkulující mRNA_{AFP})

Je známo, že nádorové buňky na rozdíl
od nenádorových ztrácejí kontaktní aktivi-
tu a relativně snadno se uvolňují z vazby
na sousední buňky a dostávají se tak do
krevní cirkulace. Tam mohou být prokázá-
ny na základě mRNA kódující jejich speci-
fický nádorový marker (kupř. AFP) pomo-
cí RT-polymerasové řetězové reakce (RT-
PCR). Je tak možno i velmi malý počet ná-
dorových buněk pomnožit až na hranici
detekovatelnosti. Některé předběžné vý-
sledky však zatím neprokázaly klinickou
použitelnost pro lepší sledování prognózy
a úspěšnosti terapie HCC u chirurgických
léčebných zákroků. Naopak slibné jsou
výsledky s vyšetřením mRNA-AFP pomo-
cí kvantitativní RT-PCR v reálném čase jak
v cirkulující krvi tak v krvi z kostní dřeně
u pacientů s HCC v perioperačním období
při kurativní resekci jater; pomáhají určit
prognózu, tj. pozdější přežití nebo naopak
rekurenci choroby. Jiní autoři referují
o kombinaci stanovení frakce AFP speci-
fické pro HCC v mononukleárech
a mRNA-AFP v periferní krvi. Popisovaná
technika zlepšuje prokazatelně senzitivitu
i specifitu diagnózy HCC i monitorování
relapsu nebo metastáz. Na užitečnost vy-

šetření mRNA-AFP v periferní krvi jako
markeru návratnosti HCC poukazují i další
autoři. Čínští autoři doporučují vyšetřovat
volné nukleové kyseliny v plasmě jako
transkript AA454543 RNA pro sledování
prognózy pacientů s HCC léčených kura-
tivní parciální hepatektomií. Jiní autoři na-
lezli signifikantní zvýšení volně cirkulující
DNA (cell-free DNA) pomocí stanovení
genu pro glutathion-S-transferázu -
GSTP1 metodou PCR v reálném čase (Real
Time PCR) u pacientů s chronickou hepa-
titidou C přecházející do hepatocelulární-
ho karcinomu.

* Detekce nádorových ložisek (produ-
kujících AFP) „*in vivo*“ pomocí specifických
značených anti-AFP-protilátek

Pomocí specifických (monoklonálních)
značkových anti-AFP protilátek apliko-
vaných do krevního oběhu pacienta lze
zobrazovacími metodami rozpoznat AFP-
produktivní nádorová ložiska.

* Rozlišení „nádorového a nenádoro-
vého“ AFP; rozdíl mezi HCC-AFP pozitivním
a HCC-AFP negativním

Patologicky zvýšená syntéza AFP je
nejen specifickým projevem určitých ma-
ligních nádorů, ale vzniká též při regene-
raci jaterního parenchymu navozené par-
ciální hepatektomií nebo po aplikaci he-
patotoxických látek. Příkladem využití AFP
jako prognostického markeru pro regene-
rační schopnost jater je monitorování
AFP v séru při otravě acetaminofenem.
Koncentrace AFP nad 4 µg/l, která se ob-
jevuje 1 den po maximální hodnotě ALT, je
považována za prognosticky příznivé zna-
mení. Je proto snaha odlišit tento užitečný
proces od jiného patologického stavu,
kterým je maligní nádorové onemocnění.
Některé studie naznačují, že *existují určité
odlišné isoformy, epitopy a konformační
varianty AFP* podmíněné různými fyziolo-
gickými nebo patologickými situacemi.
Monoklonální protilátky rozlišující tumor-
ové a non-tumorové varianty AFP by
zlepšily diagnostiku AFP-produktivních
nádorů.

Otázky teoretické:

- **Biologický význam AFP:**

* Vazba AFP na mateřské estrogenu
(inhibice hormonální aktivity, obrana plo-
du vůči nežádoucímu účinku mateřského
estradiolu-17β, event. jiných steroidních
hormonů)

* blokace nežádoucího účinku mateř-
ského imunitního systému na plod, potla-
čující efekt na uplatnění reakce „štěpu
vůči hostiteli“ před ještě nedostatečně
vyvinutou placentární bariérou

* Vazba environmentálních toxinů na
AFP plodu (dioxiny, abusus drog) z cirku-
lace matky → ochrana před embryotoxici-
tou a fetotoxicitou

* Glykace AFP u těhotenského diabe-
tu; vliv hyperglykemie na vývoj plodu

* Antioxidační účinek volných SH-
skupin molekul AFP v nejčasnějším stádiu
embryogeneze (implantace blastocytu)

- **Studium hepatokancerogeneze**

Otázka dediferenciace nebo retrodife-
renciace nebo jde o „karikaturu“ diferenci-
ace maligně transformovaných kmeno-
vých buněk jaterních, žloutkového váčku,
primitivního střeva?

- **AFP a protinádorová terapie**

V posledních deseti letech řada experi-
mentálních studií prokázala, že AFP hraje
význačnou roli v regulaci růstu jak v on-
togeneze tak v tumorigeneze. Důležité
však je, že za určitých okolností může růst
(proliferaci) nejen stimulovat, ale též inhi-
bovat. V tomto smyslu je nadějný tzv.

**GIP-34 segment (=growth inhibitory pep-
tide of AFP)**, což je 34-merní sekvence lid-
ského AFP, označovaný jako **P149** a kte-
rý byl chemicky syntetizován a fyzikálně-
chemicky charakterizován. Jeho anti-on-
kogenní aktivita (cytostatická) byla in vi-
tro testována a prokázána na kulturách ná-
dorových buněk karcinomu prsu, vaječní-
ků nebo prostaty; v experimentu na my-
ších *in vivo* měl cytostatický účinek vůči
transplantovatelnému karcinomu prsu.
Byl také připraven **GIP-8 peptid**, který je
8-merní karboxyterminální sekvencí před-
cházejícího GIP-34 a který má rovněž pro-
tinádorový efekt.

Je známo, že abnormální proteiny kó-
dované aberantními geny buněk HCC mají
potenciální antigenicitu, ale nemohou pů-
sobil jako účinný imunogen, vůči němuž
by bylo možno připravit DNA vakcínu po-
užitelnou pro léčení HCC. Zeng a spolu-
pracovníci připravili rekombinantní euka-
ryontní vektor pro cDNA-fragment AFP
z buněčné linie myšího hepatomu - **PEGF-
N3/AFP1 a 2**, transfekcí přeneseny do
dendritických buněk (DCs). Takto modifi-
kované dendritické buňky aktivovaly spe-
cificky T-lymfocyty *in vitro* a navodily
tak jejich efektivní imunitní odpověď vůči

buňkám hepatomu.

Inokulace plasmidové DNA kódující antigeny s nádorem sdružené je další novou účinnou strategií pro antitumorovou vakcinaci. *Tian* a spol. zkonstruovali DNA vakcínu myšičího AFP, která navozovala imunologickou celulórní odpověď a signifikantní antitumorovou aktivitu u myši, aniž negativně ovlivnila jejich jaterní nebo ledvinové funkce.

- Otázka syntézy AFP (průkaz v nádoru) u jiných nádorů: mléčná žláza, prostata, ledviny

- AFP (jeho deriváty) jako signální molekula (průběh a ovlivnění signálních drah a následná buněčná aktivita)

Závěr: Tento referát (minireview) mohl postihnout jen zlomek publikovaných studií o AFP z hlediska teoretického, experimentálního nebo klinického (počet publikací obsahujících termín „fetoprotein“ dle bibliografické databáze **PubMed - NHL**

činí až do do září 2007 více než **15 180**, jen za rok 2006 to je **494**). Chtěli jsme demonstrovat, že jeho výzkum i praktická aplikace v diagnostice, terapii nebo funkční proteomice zaujímá stále důležité místo. Za témata (topics) zasluhující pozornosti považujeme následující okruhy:

- Standardizace stanovení AFP: výběr a unifikace nejvhodnějšího anti-AFP imunního séra zachycující nejtýpčtější antigenní determinanty (epitopy) nativního AFP i jeho variant; unifikace mezinárodního standardu AFP pro různé účely vyšetření AFP (průkaz a monitorování nádorů, prenatální diagnostika vývojových vad, regenerace jaterního parenchymu apod.)
- Výběr nejvhodnějších parametrů (kritéria) pro screening, diferenciální diagnostiku, prognózu a sledování úspěšnosti terapie hepatocelulárního karcinomu (event. jiných AFP-pozitivních tu-

morů)

- Využití AFP (fragmentů, derivátů) pro terapii AFP-pozitivních (event. i jiných) tumorů
- Studium AFP jako signální molekuly v mechanismu buněčných aktivit (využití pro genovou terapii nebo účinku na klíčové molekuly tumorigeneze)
- Vyjasnění neočekávaných zvýšení AFP v cirkulaci nebo tkáni u jiných nádorů, jaterních i mimojaterních (mezenchymální hamartomy, některé nádory ledvin, plíc, tlustého střeva a další)
- Objasnění některých dalších biologických funkcí AFP v průběhu ontogeneze (kupř. antioxidační aktivita realizovaná dvěma volnými SH-skupinami nebo ochrana před genotoxickými jedy v nejčasnějším stádiu vývoje zárodku).

(Podrobná literatura u autora: jaromasopust@seznam.cz)

Setkání diabetiků v Luhačovicích

14. listopad byl před lety vyhlášen Mezinárodním dnem diabetu. V celém světě se tak připomíná onemocnění, které postihuje více než 170 milionů lidí, v České republice více než 750 000 jedinců.

Čeští diabetici mají velmi aktivní organizaci - Svaz diabetiků - který se stará o edukační aktivity svých členů a organizuje četná setkání pacientů, včetně akcí pro dětské diabetiky.

Tradiční setkání Svazu diabetiků se letos opět v polovině listopadu uskuteč-

nilo v lázních Luhačovice. Ve dnech 15. - 18. listopadu byl pro diabetiky připravený hodnotný edukační program, lákavé sportovní vyžití a zajímavé kulturní akce.

Divize Diabetes Care naší společnosti patří ke sponzorům Svazu diabetiků a pravidelně se setkání účastní formou výstavního stánku a edukačních příspěvků. V loňském roce jsme zajistili přednášku o problematice hypertenze u diabetiků, v letošním roce jsme byli požádáni o prezentaci na téma Význam selfmonitoringu pro management diabetu.

Selfmonitoring u diabetiků je nedílnou součástí léčby pacientů. V užším slova smyslu jde o sebekontroly hladin krevního cukru diabetikem, v širším slova smyslu sem patří i kontroly krevního tlaku (pomocí domácích přístrojů na měření tlaku krve), sebetestování moči pomocí proužků (stanovení bílkoviny v moči, ketolátek, glukózy), kontroly tělesné hmotnosti (velmi významné zvláště pro diabetiky 2. typu), péče o nohy i plánování diabetické stravy.

Odborníci považují selfmonitoring za jeden z milníků péče o diabetiky, který je srovnatelný s objevem inzulínu.

Podle doporučení České diabetologické společnosti jsou jako optimální považovány u spolupracujícího pacienta tyto frekvence měření:

- 3 až 4 měření denně pro pacienty léčené intenzifikovaným inzulínovým režimem (= tři a více dávek inzulínu denně nebo inzulínová pumpa)
- 2 měření za den pro pacienty léčené konvenčním inzulínovým režimem (= jedna až dvě dávky inzulínu denně)
- 3 měření týdně u pacientů léčených perorálními antidiabetiky nebo jen samotnou dietou.

Zatímco diabetici 1. typu (tedy životně na inzulínu závislí) již přijali selfmonitoring za běžnou součást své léčby, u diabetiků 2. typu tomu tak zatím u nás není. Naše společnost nabízí pro selfmonitoring krevního cukru několik typů glukometrů, mezi přední značky patří Accu-Chek® GO a Accu-Chek® Active.

-oba-

