

ENZIMI KAO TUMORSKI MARKERI

Nada Majkić-Singh

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

Kratak sadržaj: Klasična proučavanja Warburga pre više od 80 godina ukazala su na razlike koje se javljaju u brzini glikolitičkih procesa u zdravim i malignim tkivima što je podstaklo na hiljade studija koje su za osnov imale da pokažu da enzimi odražavaju maligni proces. Ova izučavanja su omogućila procenu glikolitičkih, tako i drugih enzima u malignim i zdravim tkivima, kao i u krvi i drugim telesnim tečnostima pacijenata s karcinomom. Uprkos brojnim proučavanjima, još uvek nisu otkriveni specifični enzimi samo za kancer. Međutim, merenja enzima u tkivima, krvi i telesnim tečnostima imaju veoma važnu ulogu u praćenju i zbrinjavanju pacijenta s karcinomom. Svrha ovog rada je da prikaže enzime koji imaju tradicionalnu ulogu u enzimologiji kancera, kao i one koji još uvek traže mesto u protokolima za tretman pacijenata s karcinomom.

Ključne reči: enzimi, tumorski markeri, telesne tečnosti, metodologija

Uvod

Enzimi pripadaju prvoj grupi korišćenih tumorskih markera. U proteinskom sadržaju tumora veoma značajnu ulogu imaju enzimi koji bi sa teoretske tačke gledišta mogli da budu dobri tumorski markeri kako za dijagnozu tako i za praćenje malignog oboljenja kod čoveka, s obzirom da održavaju metaboličke promene u tumorima (1).

Merenje enzima je relativno jednostavno na osnovu spektrofotometrijskog određivanja enzimске aktivnosti. Uvođenjem radioimunoodređivanja 1950. godine prvi put je omogućeno i merenje enzima kao proteinskog antigena umesto katalitičke aktivnosti. Međutim, osim nekoliko izuzetaka povećanje aktivnosti ili mase enzima ili izoenzima nije dovoljno specifično ili osetljivo za identifikaciju tipa karcinoma ili specifičnog uključivanja nekog organa. Jedan od takvih izuzetaka je PSA, koji ima umerenu proteaznu aktivnost i homologu aminokiselinsku sekvencu koja odgovara serin proteazama familije kalikreina (2, 3). Ispoljava se kod normalne, benigne, hiperplastične i kancerozne prostate, a minimalno u drugim tkivima (4). Sve do otkrivanja PSA kao markera karcinoma prostate, popularnost enzima kao markera bila je značajno umanjena (5, 6). Enzimi su naročito korišćeni kao tumorski markeri pre otkrivanja onkofetalnih antigena i prednosti otkrivanja monoklonskih antitela (7). Patologija enzima kao markera karcinoma ogleda

se ispoljavanjem fetalnog oblika enzima ili izoenzima ili ektopičnom produkcijom enzima.

Patogeneza enzimskih markera

Sve somatske ćelije imaju isti set gena. U toku ontogeneze neki geni se uključuju (usled depresije), a drugi se isključuju (usled represije). U toku normalnog procesa diferencijacije normalnih ćelija pod dejstvom gena uspostavlja se sekvencija koja je karakteristična za svaku vrstu ćelija (8). Proučavanja enzima i izoenzima u ćelijama tumora ukazala su da za razliku od normalnih ćelija u ovim ćelijama postoji drugačije izražavanje gena. Iz ovog razloga u neoplastičnim tkivima su nađene povećane (i izmenjene) aktivnosti skoro svih enzima koji su uključeni u glikolizu, pentozno-fosfatni put, glukoneogenezu, oksidativnu fosforilaciju, ciklus uree, metabolizam nukleinskih kiselina (9).

Izmene profila enzima i izoenzima u malignim tumorima se do danas objašnjavaju na više načina i to sledećim teorijama (9–12):

1. *Teorijom brisanja* – iščezavanje enzima i izoenzima unutar tkiva tumora objašnjava se nestajanjem esencijalnih proteina u tumoru. Ovom teorijom nije međutim, moguće objasniti kvantitativne promene enzima i izoenzima ili njihovo ponovno pojavljivanje u tkivu tumora, mada se fiziološki ne nalaze u normalnom odraslom organizmu.

2. *Teorijom anaerobne glikolize* – objašnjava se uglavnom pojava enzima i izoenzima glikolitičkog puta, s obzirom da je anaerobna glikoliza često jako povećana u tumorima. Međutim, anaerobna glikoliza nije povećana kod svih tumora.
3. *Teorijom priticanja* – ukazuje se da fenotipski profil različitih enzima i izoenzima u tumorima odgovara izvornom tkivu iz koga tumor potiče. Međutim, danas je opšte prihvaćeno da se enzimski profil može značajno da razlikuje od izvornog tkiva.
4. *Molekularnom korelacionom teorijom* – izmene enzimskih i izoenzimskih profila pri rastu tumora se tumače promenama koje su vezane za progres tumora ili promenama koje su vezane za transformaciju tumora. Pri ovakvim stanjima odigravaju se sintetički i degradacioni procesi koji utiču i na promenjene enzimske profile.
5. *Teorijom disdiferencijacije* – podrazumeva se da se promene u genetskom sastavu javljaju u ćelijama tumora i njihovim fenotipovima. Nastale promene se razlikuju od onih u normalnim ćelijama. Često su enzimi koji nastaju na ovaj način fenotipski slični onim u fetalnim tkivima (otud naziv dediferencijacija; v. niže pod 6). Prema tome, patološki enzimi i izoenzimi nastaju usled represije ili derepresije odgovarajućih gena u toku karcinogeneze. Često se u ćelijama tumora nalaze i fenotipovi enzima i izoenzima koji su identični organu koji je domaćin tumora.
6. *Teorijom dediferencijacije* – objašnjava se način ponovnog pojavljivanja enzima ili izoenzima u ćelijama tumora, koji su postojali za vreme fetalnog ži-

vota. Normalno usled procesa represije nakon rođenja zaustavlja se produkcija ovakvih proteina, međutim pojavom malignog tumora dolazi do biosinteze fetalnih enzima i izoenzima u neoplastičnim ćelijama. Posledica ovakvog procesa je pojava tzv. »karcino-embriogenih proteina«, koji se nalaze kako u fetalnim ili placentalnim organima tako i u malignim tumorima.

Uloga karcino-embriogenih proteina još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Neki su hormoni, kao što je β -humani horioni gonadotropin, a drugi enzimi kao npr. Reganov izoenzim alkalne fosfataze.

Klinička primena

Enzimi se u ćelijama nalaze u visokim koncentracijama odakle prelaze u cirkulaciju usled nekroze tumora ili izmene permeabiliteta ćelija karcinoma. Povećani nivoi enzimskih aktivnosti javljaju se i usled bloka pankreasnih i bilijarnih puteva i renalne insuficijencije. Međutim, pre nego što dođe do izlivanja enzima mogle su da se dogode metastaze tumora. Većina enzima takođe nije karakteristika samo jednog organa. To znači da su enzimi najpogodniji kao *nepospecifični tumorski markeri*, mada povišen nivo enzima može da signalizira prisustvo malignog procesa.

Izoenzimi i multipli oblici enzima obezbeđuju dodatnu organspecifičnost. Tradicionalno se uglavnom meri aktivnost enzima, mada je primenom antitela moguće merenje i antigenskih svojstava enzima kao proteina. U *tabeli 1* prikazani su primeri nekih enzima koji su karakteristični za određeni tip karcinoma, kao i postupak određivanja.

Tabela 1 Enzimi koji su tumorski markeri

Enzim	Određivanje	Tip karcinoma
Alkohol dehidrogenaza	Akt	Jetra
Aldolaza	Akt	Jetra
Alkalna fosfataza	Akt	Kost, jetra, leukemija, sarkom
Alkalna fosfataza-placentalna	Akt	Ovariji, pluća, seminom, Hodgkin
Amilaza	Akt	Pankreas, različiti
Aril sulfataza B	Akt	Kolon, dojka
Kreatin kinaza BB	Akt	Prostata, pluća (male ćelije), dojka, kolon, ovariji
Esteraza	Akt	Dojka
Galaktoziltransferaza	Akt	Kolon, bešika, gastrointestinalni
γ -glutamilttransferaza	Akt	Jetra
Heksokinaza	Akt	Jetra
Laktat dehidrogenaza	Akt	Jetra, limfomi, leukemija, različiti
Leucin aminopeptidaza	Akt	Pankreas, jetra
Neuron-specifična enolaza	RIA, EIA	Pluća (male ćelije), neuroblastom, karcinoidni, melanom, feohromocitom, pankreas, Jetra
5'-nukleotidaza	Akt	Jetra
Prostatična kisela fosfataza	Akt /IMA	Prostata
PSA	Akt	Prostata
Piruvat kinaza	Akt	Jetra, različiti
Ribonukelaza	Akt	Različiti (ovariji, pluća)
Terminalna deoksitransferaza	Akt	Leukemija
Timidin kinaza	RIA/Act	Različiti, leukemija, limfomi, pluća (male ćelije)

Bez obzira na potencijalne mogućnosti, do danas nije došlo do intenzivnijeg korišćenja enzima i izoenzima za primarnu dijagnozu ili praćenje tumora. Za ovo postoji više razloga od kojih treba navesti sledeće:

- a) Većina enzima i izoenzima koji se sintetišu u tkivu tumora se ne izlučuju u serum. Shodno tome promene koje se događaju u tumoru ne preslikavaju se na serum;
- b) Pojedini enzimi i izoenzimi nalaze se u serumu u tako malim koncentracijama, da ih nije moguće otkriti uobičajenim metodama;
- c) Većina enzima nalazi se i normalno u različitim organima, tako da nije moguće utvrditi da li enzim koji se nalazi u serumu ima fiziološko poreklo ili potiče iz tumora, i
- d) Do sada nije izvršena biohemijska klasifikacija tumora koja bi se zasnivala na raspodeli enzima i izoenzima, koji potiču iz tkiva tumora.

Bez obzira na ove poteškoće ovde će biti opisani enzimi koji su se do danas koristili pri dijagnostikovanju i praćenju malignih tumora (9, 13, 14).

Enzimi kao tumorski markeri

Aktivnosti enzima se mere uobičajenim postupcima, i to najčešće pomoću fotometrijskih metoda. Izoenzimi se analiziraju: elektroforetski, hromatografski na koloni, izoelektrofokusanjem, semi-kuantitativnim postupcima koji se zasnivaju na inhibiciji i denaturaciji izoenzima, imunološkim postupcima, radioaktivnim postupcima itd. Prema tome svi postupci koji se inače primenjuju za analiziranje enzima koriste se za određivanje enzima u slučaju malignih tumora. Aktivnost se određuje u serumu, sekretu ili izlivima.

U tabeli 1 prikazani su enzimi koji mogu da budu korisni za otkrivanje malignih tumora.

Alkalna fosfataza potiče iz jetre, kostiju ili placente. U serumu zdravih osoba primarno se nalazi alkalna fosfataza iz jetre ili bilijarnog trakta. Povišeni nivoi alkalne fosfataze nalaze se u primarnom ili sekundarnom karcinomu jetre. Određivanje nivoa alkalne fosfataze značajno je za procenu metastatskog karcinoma na kostima ili jetri. Najveća povišenja nalaze se u pacijenata s osteoplastnim lezijama, kao u slučaju karcinoma prostate s metastazama na kostima. Manja povišenja nalaze se kod pacijenata s karcinomom dojke i metastazama na kostima (15, 16).

Da bi se diferencirali izvori koji dovodi do povišenja alkalne fosfataze mogu se određivati i drugi enzimi kao što su 5-nukleotidaza ili γ -glutamilttransferaza. Određivanje izoenzima alkalne fosfataze može dodatno da poveća specifičnost analiziranja. Jetreni izoenzim je termostabilniji od koštanog izoenzima. I

kod drugih malignih stanja kao npr. kod leukemija, sarkoma i limfoma u kojih postoji hepatična infiltracija, takođe mogu da se nađu povećani nivoi alkalne fosfataze.

Placentalna alkalna fosfataza (PALP) sintetise se u trofoblastu i povećana je u trudnica. PALP je prvi put identifikovana kao Reganov izoenzim 1968. godine, kada je uvrštena u onkorazvojne markere zajedno sa AFP i CEA. Povećava se kod različitih malignih stanja, uključujući karcinome pluća i ovarija, trofoblastne i gastrointestinalne karcinome, seminome i Hodgkinovo oboljenje.

Kreatin kinaza (CK) katalizuje fosforilaciju kreatina s adozin-trifosfatom. CK je dimer koji se sastoji iz M (mišićne) i B (moždane) subjedinice. Ima tri izoenzima CK1 (BB), CK2 (MB) i CK3 (MM). CK1 se nalazi u mozgu, prostati, gastrointestinalnom traktu, plućima, mokraćnoj bešici, uterusu i placenti. U srčanom mišiću najzastupljeniji je izoenzim CK2. CK3 se nalazi u srčanom i skeletnim mišićima.

Povišeni nivoi CK1 nalaze se u karcinomu prostate i karcinomu malih ćelija pluća. Mada je aktivnost ovog izoenzima povišena i u slučaju drugih malignih stanja (npr. dojke, kolona, ovarija, želudca) neophodna su dalja ispitivanja njegove kliničke značajnosti (17). Izoenzimi CK su uključeni u panel karcinoma prostate poznat kao »ProstASURE« (18, 19).

Laktat-dehidrogenaza (LD) je enzim glikolitičkog puta tako da je njeno povišenje rezultat oštećenja ćelija. Povišenje aktivnosti LD u malignim stanjima je prilično nespecifično i nalazi se kod brojnih karcinoma uključujući jetru, non-Hodginov limfom, akutnu leukemiju, seminom, neuroblastom, karcinom dojke, kolon, želudac i pluća. Nivo aktivnosti LD u serumu je u korelaciji s masom tumora kod čvrstih tumora i prognostički je indikator progresa oboljenja. Značaj LD u praćenju terapije je mali. Analiza izoenzima takođe ne doprinosi značajnoj organo-specifičnosti. Tako se npr. povišenje izoenzima LD5 nalazi u slučaju metastaza na jetri, ali i u likvoru kad ukazuje na metastaze centralnog nervnog sistema (17).

Enolaza je glikolitički enzim koja je takođe poznata kao fosfopiruvat-hidrataza. *Neuron-specifična enolaza (NSE)* je oblik enolaze koja se nalazi u neuralnom tkivu i u ćelijama difuznog neuroendokrinog sistema i utroška aminskih prekursora i dekarboksilacionih tkiva (APUD). NSE se nalazi u tumorima koji su neuroendokrinog porekla, kao npr. kod karcinoma malih ćelija pluća (SCLC), neuroblastoma, feohromocitoma, karcinoidnih, medularnih karcinoma tireoidne, melanoma i pankreasnih endokrinih tumora (20).

Kisele fosfataze su fosfataze koje hidrolizuju fosfatne estere pri pH optimumu manjem od 7,0. Nalaze se u lizozomima sekretornih epitelijalnih ćelija. Mada se fosfataza primarno stvara u prostati, takođe se nalazi u eritrocitima, trombocitima, leukocitima,

kostnoj srži, kostima, jetri, slezini, bubrežima i tankom crevu.

Prostatična kiselna fosfataza (PAP) sa pH optimumom od 5 do 6 je veoma labilna pri pH vrednostima većim od 7,0 i temperaturi iznad 37 °C. Od drugih kiselih fosfataza razlikuje se primenom tartarata, koji izrazito inhibira prostatični izoenzim. Drugi način razlikovanja postiže se primenom supstrata koji su specifični za PAP. Dva najčešće korišćena supstrata su timolftalein-monofosfat i β-naftil fosfat.

Kao tumorski marker kiselna fosfataza se koristi od 1938. godine, kada je primenjena za skrining karcinoma prostate (1, 21). Takođe je korišćena i za procenu stadijuma karcinoma prostate, za prognozu i praćenje terapije ovog karcinoma. Povišeni nivo PAP u serumu nalaze se i kod osteogenog sarkoma, multiplog mijeloma, metastaza na kostima i drugih karcinoma. Povećava se i kod nekih benignih stanja, kao npr kod BPH, osteoporoze i hiperparatireoidizma.

Do sada se kod čvrstih tumora pokazala veoma značajna prostatična kiselna fosfataza. Ovaj enzim se povećava u serumu pacijenata s karcinomom prostate. Do povećanja verovatno dolazi zbog toga što se povećava ukupna količina tkiva prostate. Retko se ovaj enzim povećava u stupnjevima O, A i u početnom stupnju B. Enzim se povećava od 65 do 92% kod pacijenata kod kojih dolazi do stupnja D (metastaza na kostima). Lažno pozitivni rezultati dobijaju se usled povećanja kisele fosfataze kod prostatitisa, benignog prostatičnog tumora, ili nakon rektalne palpacije. Kiselna fosfataza može da potiče iz drugih organa i to iz: kostiju, eritrocita, leukocita, trombocita itd. Iz ovog razloga preporučuje se veoma osetljivo enzimsko-immuno određivanje prostatične kisele fosfataze, koje se zasniva na primeni monoklonalnih antitela (9).

Danas je klinička primena PAP zamenjena sa PSA, s obzirom da PAP nije tako osetljiva za rano otkrivanje karcinoma. Tako je danas klinička primena PAP ograničena na potvrđivanje karcinoma prostate i utvrđivanje njegovog stadijuma (22, 23).

Kalikeireni pripadaju podgrupi serin proteaza kao enzimске familije, od kojih tri imaju specifičnu biološku ulogu. Svi su *humani kalikeireni (hk)* slične genetske strukture i nalaze se u brojnim tkivima (prostata, dojka, ovarij, testis). Tako je npr. KLK3 (PSA) visoko izražen u prostati, a manje u dojci, tireoidei, pljuvačnim žlezdama, plućima i traheji.

Samo tri od ukupno 15 kalikeireina imaju specifičnu biološku ulogu. Uloga kalikeireina kao tumorskih markera je jako široka, s obzirom da su udruženi s hormonskim malignitetima (prostata, dojka, testikularni i ovarijalni karcinomi). Uloga kK3 (PSA) je ovde posebno opisana (3).

Prostatični-specifični antigen (PSA) je jedan od najznačajnijih tumorskih markera, s obzirom da je jedan od nekoliko organo-specifičnih markera. PSA je

otkrio Hara sa saradnicima 1971. godine. Ovaj seminalni plazma protein su nazvali *γ-seminoprotein*, dok ga je 1979. godine Wang sa sar. izolovao iz tkiva prostate i nazvao *prostatični-specifični antigen*. PSA se nalazi u normalnom, benignom, hiperplastičnom i malignom tkivu prostate.

PSA je jedno-lančani glikoprotein sa 7% ugljenih hidrata. Ima 237 aminokiselinskih ostataka i četiri bočna lanca ugljenih hidrata povezanih preko aminokiselina asparagina, serina, treonina i serina. N-terminalna aminokiselina je izoleucin, a C-terminalni ostatak je prolin. Gen koji određuje PSA lokalizovan je na hromozomu 19. Sličan je kalikrein-1 genu sa 82% homologije. Funkcionalno, PSA je serin proteaza iz kalikreinske familije, koju isključivo stvaraju epitelijelne ćelije acinusa i duktusa prostate. U seminalnoj tečnosti PSA razrađuje specifične proteine do proteina manjih molekulskih masa koji sudeluju u procesu likvefakcije i seminalne koagulacije. To znači da je aktivnost PSA slična himotripsinu i tripsinu. Autodigestija PSA je moguća na tri pložaja i to Lys 148, Lys 185 i Arg 85. Da bi se sprečila autodigestija PSA u rastvoru dodaju se inhibitori proteaza.

U krvnoj cirkulaciji postoje dva glavna oblika PSA. PSA je uglavnom kompleksiran s inhibitorom proteaze α₁-antihimotripsinom (ACT) ili sa α₂-makroglobulinom (AMG) ili manjim komponentama slobodnog PSA. Pomoću većine imunohemijskih metoda meri se slobodni i ACT-kompleksirani PSA, ali ne i AMG-PSA.

PSA je krajnje koristan tumorski marker za karcinom prostate. Koristi se za otkrivanje stadijuma karcinoma, kao i za praćenje tretmana karcinoma prostate (24–27). Određivanje PSA nije toliko značajno u skriningu ili ranom otkrivanju karcinoma prostate zato što je PSA specifičan za tkivo prostate a ne za sam karcinom prostate. BPH je uobičajeno oboljenje kod muškaraca iznad 50 godine starosti, a vrednosti PSA u ovih pacijenata su slične onima kod ranog stadijuma karcinoma prostate. Iz ovog razloga izbor 4 ili 10 μg/L kao optimalnih cut-off vrednosti za PSA je takoreći nemoguć zbog preklapanja PSA između dve navedene grupe. Međutim, korišćenje serumskih vrednosti PSA sa digitalnim rektalnim pregledom, praćenim transrektalnom ultrasonografijom pruža mnogo tačniju i osetljiviju dijagnozu od samog digitalnog pregleda.

Da bi se sposobnost PSA za rano otkrivanje karcinoma prostate povećala učinjeno je više poboljšanja: utvrđeni su referentni intervali po dekadama starosti i to od 0 do 2,5 μg/L za muškarce starosti 40 do 49 godina; 0 do 3,5 μg/L za 50 do 59 godina; 0 do 4,5 μg/L za 60 do 69 godina; i 0 do 6,5 μg/L za 70 do 79 godina starosti. Snižavanjem gornje granice normale omogućeno je češće otkrivanje karcinoma prostate kod mlađih muškaraca, u kojih će potencijalno izlječenje radikalnom prostatektomijom biti uspešnije. Drugo poboljšanje postignuto je primenom *gustine PSA*, koja se dobija deljenjem koncen-

tracije PSA sa zapreminom prostate koja se određuje transrektalnom ultrasonografijom. Tako pacijenti s koncentracijom PSA između 4 i 10 $\mu\text{g/L}$, negativnim rezultatom digitalnog rektalnog pregleda i povećanom PSA gustinom imaju povećan rizik za karcinom prostate. Treća mogućnost postiže se preko PSA brzine, koja govori o brzini povećanja PSA s vremenom. Nakon uspostavljanja baznog nivoa PSA za svakog pacijenta izračunava se brzina rasta PSA. Kako se PSA različito povećava kod zdravih, BPH pacijenta i karcinoma prostate, to je značajnost ovog parametra najveća za karcinom pošto kod ovih pacijenata PSA najviše raste (više od 0,75 $\mu\text{g/L/god}$).

Procenat slobodnog PSA poboljšava osetljivost i specifičnost pri otkrivanju karcinoma prostate, naročito kod pacijenata u dijagnostičkoj »sivoj« zoni PSA između 4 i 10 $\mu\text{g/L}$ ili 2 ili 20 $\mu\text{g/L}$. ProPSA (pPSA) takođe poboljšava fPSA u otkrivanju karcinoma prostate sa ukupnim PSA u oblasti 2,5 ili 4,0 $\mu\text{g/L}$. Kompleksirani PSA (cPSA) se pokazao značajnim u poboljšanju specifičnosti ukupnog PSA pri otkrivanju karcinoma prostate u multicentričnim kliničkim ispitivanjima.

Danas se za određivanje PSA koriste kako tradicionalna tako i ultrasenzitivna određivanja zasnovana na imunoodređivanju uz primenu različitih obeleživača (enzim, fluorescencija, hemiluminescencija) (28). Mora se, međutim, voditi računa o kalibraciji, matriksu, reakcionom vremenu, osetljivosti, nepreciznosti itd. Takođe se mora znati da antitela reaguju s različitim PSA epitopima, što znači i s različitim molekularnim oblicima PSA.

Ultrasenzitivna određivanja PSA omogućavaju određivanje 0,01 do 0,001 $\mu\text{g/L}$, što je mnogo manje nego primenom tradicionalnih PSA određivanja. Najznačajnija primena ovog određivanja je u otkrivanju zaostalog karcinoma prostate nakon radikalne prostatektomije.

Humani glandularni kalikrein 2 (hK2) i PSA (humani kalikrein 3) su serin proteaze koje imaju 80% identičnost u proteinskoj sekvenci i skoro se isključivo nalaze u prostatičnom epitelu (29). Slično PSA, koncentracija hK2 je 100 000 puta veća u seminalnoj tečnosti nego u serumu (30). hK2 ima sposobnost da formira komplekse sa endogenim anti-proteazama. Značajan inhibitor je protein-C-inhibitor (PCI) koji u seminalnoj tečnosti kao najveći ligand kompleksira hK2, dok se u *in vitro* uslovima hK2 kompleksira sa alfa₂-antiplazminom, alfa₂-makroglobulinom, ACT, antitrombinom III, C1-inaktivatorom i plazminogen aktivator inhibitorom-1.

hK2 je značajan pri imunohistohemijskom otkrivanju stupnja karcinoma i metastaza limfnih čvorova (31).

Urokinaza-plazminogen aktivator sistem se sastoji iz tri glavne komponente, urokinaza-pazminogen aktivatora (uPA, 53 kDa serin proteaza), uPA re-

ceptora vezanog za membranu (uPAR) i uPA inhibitora, PAI-1 i PAI-2. uPA se koristi kao prognostički marker karcinoma dojke i brojnih drugih karcinoma (32–35).

uPA se stvara kao prost inaktivni polipeptid, koji se aktivira cepanjem između lizina 158 i izoleucina 159. Razgradnju katalizuju brojne proteaze, uključujući katepsine B i L i hK2. Aktivni oblik uPSA sadrži jedan A-lanac, koji reaguje sa svojim receptorom, i katalitički aktivnim B-lancom. Zna se za aktivnost uPA u prevođenju plazminogena u aktivni plazmin, koji razgrađuje komponente ekstracelularnog matriksa (ECM) i aktivira metaloproteinaze matriksa (MMPs), koje zatim dalje razgrađuju ECM i aktiviraju i oslobađaju specifične hormone rasta (fibroblastni hormon rasta, [FGF]2 i transformišući hormon rasta, [TGF]-?). Aktivnost uPA *in vivo* kontrolišu dva inhibitora molekula, PAI-1 i PAI-2. Ova dva inhibitora imaju i druge funkcije u angiogenezi, ćelijskoj adheziji i migraciji i inhibiciji apoptoze.

uPA se koristi kao prognostički marker za karcinom dojke, kao i za druge brojne karcinome (36).

Katepsini su lizosomalne proteaze od kojih je proučava uloga katepsina B, D i L u razvoju i progresu tumora. Slično drugim proteazama, katepsini se sintetizuju kao visoko molekulski prekursori koji podležu procesu aktivacije. Katepsin B (CB) je tiol-zavisna proteaza koja se nalazi u lizozomima; aktivira se katepsinom D (CD) i metaloproteinazama iz matriksa. Aktivirani CB može aktivirati uPA i specifične metaloproteinaze. Katepsin L (CL) je po specifičnosti sličan katepsinu B, međutim neznatno je aktivan prema supstratima male molekulske mase. Katepsin D, slično CB, je lizosomalna proteinaza koja pripada aspartim proteazama.

Stvaranje i lokalizacija CB se menja u tumorima u odnosu na zdravo tkivo. U tkivu tumora vezuje se za membranu ili se izlučuje. Pojačano se stvara u tumoru dojke, kolona, pluća i prostate, zatim u gliomima, melanomima i osteoklastomima (37).

Katepsin B je prvobitno određivan pomoću hromogenih supstrata, dok je danas moguće primeniti ELISA tehniku za određivanje CB i CL. Za otkrivanje CB u tkivu primenjuje se imunohistohemijski postupak.

Matriks metaloproteinaze (MMP) čini familija od 23 strukturno sličnih cink-zavisnih endopeptidaza koje razgrađuju komponente ECM (38). Većina MMPs se izlučuje u zimogenom obliku, a aktiviraju se uklanjanjem 10kDa amino-terminalnog domena. Nakon aktiviranja njihovu proteolitičku aktivnost inhibiraju tkivni inhibitori poznati kao tkivni inhibitori metaloproteinaza (TIMPs). MMPs su funkcionalno podeljene u četiri podgrupe, koje se zasnivaju na ECM specifičnosti i to kao: kolagenaze, želatinaze, stromelizini i membranske MMPs.

MMPs ostvaruju brojne funkcije uključujući tkivno remodeliranje i zarastanje rana. Međutim, one su povezane i sa rastom tumora, invazijom i metastazama (39). Tako npr. MMP-2, MMP-3 i MMP-9 ubrzavaju rast adenokarcinoma pluća, ovarija, papilarnog tireoidnog karcinoma, endometrijalnog sarkoma itd.

MMPs se najčešće otkrivaju pomoću tzv. želatin zimografije, koja je elektroforetska tehnika za identifikaciju proteolitičke aktivnosti enzima koji se razdvajaju primenom natrijum dodecil-sulfat poliakrilamid gel elektroforeze pod neredukujućim uslovima. U tkivima se MMPs otkrivaju imunohistohemijski primenom specifičnih antitela, a u serumu i ekstraktima tkiva primenom imunoodređivanja.

Tumor-prateći tripsin inhibitor (eng. *Tumor-associated trypsin inhibitor, TATI*) je 6 kDa tripsin inhibitor koji je prvi put identifikovan u urinu pacijenta s karcinom ovarijuma. TATI je identičan ranije otkrivenom pankreasnom sekretornom tripsin inhibitoru (PSTI), koji je takođe poznat kao Kazal inhibitor. TATI stvaraju pankreasne acinarne ćelije zajedno s tripsinogenom. Izlučuje se u pankreasni sok gde čini 0,1 do 0,8% ukupnog proteina. Manje ga ima u drugim zdravim tkivima, gastrointestinalnog i urogenitalnog trakta, žučne kese, bilijarnog trakta, bubrega, pluća, jetre i dojke. TATI takođe deluje kao reaktant akutne faze i pojavljuje se pod izrazito inflamatornim uslovima. TATI sprečava autodigestiju tkiva pod dejstvom tripsinogena koji izlučuju pankreas i druga tkiva (40).

Mada se nivo TATI povećava u pankreatitisu, teškim oštećenjima i zapaljenjima, on je još uvek relativno dobar tumorski marker za različite karcinome. Mada se u većine karcinoma TATI povećava zbog povećanog stvaranja, ovo povećanje je izazvano i praćenom inflamacijom i destrukcijom tkiva.

Telomeraza se sastoji iz heksanuleotidnih ponovaka (TTAGGG) koji označavaju kraj hromozoma i inhibiraju mehanizam prepravke DNK zajedničkim spajanjem krajeva hromozoma. Telomeraza je normalno aktivna u embriogenezi, dok se umanjuje u većini somatskih ćelija pre i odmah nakon rođenja. U ćelijama tumora povećana aktivnost telomeraze predstavlja specifičan marker transformacije. Aktivnost telomeraze je nađena u više od 80% karcinoma, gde je njena aktivnost u korelaciji s progresom i prognozom tumora (41).

Drugi enzimi

Osim ovih enzima ovde treba pomenuti i neke druge enzime kao što su amilaza, lipaza, himotripsin i alanin-aminopeptidaza kod karcinoma pankreasa, glukozo-6-fosfat dehidrogenaza, heksokinaza i β -glukuronidaza kod karcinoma grlića i tela materice, α -1,4-glukozidaza i sijaliltransferaza kod karcinoma dojke i arilsulfataza B kod karcinoma debelog creva.

U slučaju nekih tumora na kostima povećava se

alkalna fosfataza koja potiče iz kostiju. Zatim kod čvrstih tumora povećava se i najveći broj glikolitičkih izoenzima, kao što su fosfofruktokinaza, fosfoheksokinaza, aldolaza, glutation-reduktaza, laktat, malat i izocitrat dehidrogenaza itd. Međutim, primena ovih enzima je veoma ograničena s obzirom da se povećavaju i u slučaju metastaza na jetri (9).

Amilaza se povećava u 8 do 40% pacijenata s karcinomom pankreasa (43). Međutim, treba imati na umu da slične promene ovog enzima u serumu i u urinu izazivaju i takva oboljenja kao što su pankreatitis, parotitis, intestinalna opstrukcija, renalna insuficijencija ili makroamilazemija (u serumu). Do povećavanja aktivnosti amilaze dolazi usled opstrukcije u odvodnim kanalima pankreasa i to sekundarno usled tumora pankreatitisa. Prema tome, promene ovog enzima odražavaju sekundarni fenomen i nisu posledica samog rasta tumora. Takođe se pokazalo da merenje amilaze, lipaze i himotripsina u pankreasnom soku (sa ili bez stimulacije sa sekretinom i/ili pankreoziminom), kao i određivanje amilaze u urinu ili merenje tripsina i himotripsina u fecesu ne potpomaže dijagnostikovanje karcinoma pankreasa, tj. rano otkrivanje rasta tumora.

Suprotno čvrstim tumorima, nespecifično povećanje *glikolitičkih enzima* može da bude od dijagnostičke pomoći kod metastatskih karcinoma. Slična je situacija i sa holestatskim enzimima koji su karakteristični za metastaze jetre. Povećanje alkalne ili kisele fosfataze je karakteristično za metastaze na kostima.

Metastatske karcinome jetre prati: 1) holestaza, 2) nekroza ćelija jetre, 3) smanjenje sinteze enzima, i 4) povremeno povećanje glikolitičkih enzima. Kao što je poznato markeri holestaze su alkalna fosfataza, leucin aminopeptidaza, 5'-nukleotidaza i γ -glutamiltanspeptidaza. Markeri nekroze ćelija su aspartat i alanin aminotransferaza, kao i mitohondrijalna glutamat dehidrogenaza. Dobar marker za sintetsku funkciju jetre je enzim holinesteraza. Laktat dehidrogenaza je pogodan marker za grupu glikolitičkih enzima. Shodno izloženom, metastatski karcinom jetre se odlikuje karakterističnim enzimskim profilom u kome postoji izrazito povećanje holestatskih enzima, umereno povećanje aminotransferaza, veoma često povećanje glutamat dehidrogenaze i umereno smanjenje aktivnosti holinesteraze (44, 45). Ovaj enzimski profil je veoma sličan onom kod ekstrahepatične žučne opstrukcije. Razlika je u tome što je kod metastatskih karcinoma mnogo veća aktivnost gama-glutamiltanspeptidaze, a ponekad je povećana i izrazito LDH. Ova dva tipa oboljenja mogu da se diferenciraju i prema vrednosti bilirubina, koji je normalan ili relativno umereno povišen u slučaju metastatskih karcinoma, a za razliku od ekstrahepatične žučne opstrukcije.

Uz već pomenute enzime preporučuje se i određivanje *fosfoheksokinaze* i karcinoembrionog

antigena (CEA), čime se povećava broj pozitivnih rezultata u slučaju metastaza na jetri, uključujući i »rano« otkrivanje rasta metastatskog karcinoma (46).

Povećanje alkalne fosfataze i/ili kisele fosfataze ukazuje na pojavu metastaza na kostima. Alkalna fosfataza ukazuje na povećanu aktivnost osteoblasta (47), kiselu fosfatazu uglavnom potiče iz osteoklasta (48). To znači da će povećanje aktivnosti alkalne fosfataze ukazivati na osteoplastne metastaze, a kiselu fosfatazu na osteoklastne metastaze. Ovo se odnosi i na primarne tumore na kostima. Mora se međutim, voditi računa da se povećana aktivnost alkalne fosfataze javlja pri svakoj stimulaciji osteoblasta i to bilo pri normalnom ili patološkom rastu, osteoporozi, osteomalaciji, posle fraktura kostiju, kod hiperparatiroidizma, Pagatovog oboljenja, leukemija, mijeloma, limfoma, kao i drugih oboljenja. S obzirom da se alkalna fosfataza povećava i u slučaju oboljenja jetre, holestaza, trudnoće ili gastrointestinalnih oboljenja, veoma je značajno istovremeno određivanje enzima, leucin aminopeptidaze, 5'-nuklotidaze ili γ -glutamyl-transpeptidaze.

Slično alkalnoj fosfatazi i kiselu fosfatazu se povećava u slučaju hiperparatiroidizma, Pagatovog oboljenja, osteoporoze, osteogenesis imperfecta, Albrightovog oboljenja, lipidoza, kao i oboljenja trombocita i eritrocita (48).

Samo se u izuzetnim slučajevima aktivnosti alkalne i kisele fosfataze povećavaju kao prvi znak klinički nepoznatih metastaza na kostima (42).

Određivanje aktivnosti enzima u malignim eksudatima i izlivima ima malog značaja s obzirom da je većina malignih eksudata krvava. Iz ovog razloga dolazi do interferencije naročito u slučaju glikolitičkih enzima (laktat i malat dehidrogenaza, heksokinaza i dr.), koji se nalaze u veoma visokim koncentracijama u eritrocitima, granulocitima i limfocitima. Prema tome, povećanje ovih enzima je značajno samo ako izlivi nisu hemoragični. Aktivnosti ovih enzima mogu da budu povećane i u slučaju ne-hemoragičnih izliva ako su oni npr. posledica bakterijske ili virusne infekcije ili tuberkuloze. Ovo je usled toga što ovakvi eksudati sadrže granulocite ili limfocite koji imaju visok sadržaj glikolitičkih enzima. Od izvesne pomoći može da bude analiza izoenzima LDH, s obzirom da hemolizat eritrocita sadrži uglavnom izoenzime LDH₁ i LDH₂. U slučaju eksudata koji su posledica malignog procesa pri elektroforetskom rastavljanju će se naći povećanje tzv. »intermedijerne« hibridne frakcije

LDH₂-LDH₄ ili povećanje izoenzima LDH₅. Međutim, ovakav izoenzimski profil se nalazi i u slučaju granulocita i limfocita.

Osim izoenzima LDH, treba pomenuti i primer izoenzima aldolaze, i to tzv. »fetalne« aldolaze A i aldolaze C, koje se javljaju pri rastu nekih tumora i to naročito hepatoma i rhabdomyosarkoma.

Histaminaza se povećava u oko 70% slučajeva pacijenata sa metastatskim karcinomom tiroidee (49), a javlja se i u slučaju nekih drugih karcinoma (npr. ovarija, bronhija itd.). Osim gore pobrajanih enzima treba pomenuti i neke druge kao što su: izoenzim V 5'-nukleotid fosfodiesteraze, izoenzim P diaforaze, cistinaminopeptidaza (oksitocinaza), placentalna protransglutaminaza, 17- β -hidroksisteroid dehidrogenaza, izoenzim III transaminaza razgranatih aminokiselina i onko-fetalni izoenzim gama-glutamyl-transpeptidaze i kancero-karakteristični izoenzim amilaze. Osim već napred opisanih enzima ovde još treba pomenuti glikozil i druge transferaze ugljenih hidrata, lizozim, fosfoheksko-izomerazu i terminalnu deoksinukleotidil transferazu.

Lizozim (muramidaza se pokazao kao pogodan enzim za klasifikaciju leukemija. Povećane aktivnosti ovog enzima su nađene u serumu 45% pacijenata s akutnom granulocitnom leukemijom, u 77% pacijenata s akutnom mijelomonocitnom leukemijom, i u 38% pacijenata s akutnom limfoblastnom leukemijom.

Terminalna deoksinukleotidil transferaza (TDT) se nalazi u veoma visokim koncentracijama u normalnom timusu i u T i non-T akutnim limfoblastnim leukemijskim ćelijama. Visoke aktivnosti su nađene u limfocitima periferne krvi i u koštanoj srži kod većine pacijenata s akutnom limfoblastnom leukemijom.

Iz izloženog se može zaključiti da veliku vrednost u otkrivanju i praćenju malignih oboljenja nemaju oni enzimi i izoenzimi koji se normalno nalaze u organizmu humanog organizma, uprkos činjenici da se u tkivu tumora nalaze njihovi karakteristični enzimski profil. Mnogo je značajnije da se enzimi ili izoenzimi nalaze isključivo u tkivu tumora i da ih normalno nema u zdravim organima. Prema tome, sve buduće napore treba usmeriti u pravcu otrivanja ovakvih enzima i izoenzima u kom slučaju bi enzimska dijagnostika malignih oboljenja bila mnogo vrednija.

Zahvalnost: Rad je urađen na osnovu Ugovora br. 145010B finansiranog od MNTR Srbije.

ENZYMES AS TUMOR MARKERS

Nada Majkić-Singh

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

Summary: The classical studies of Warburg more than 80 years ago outlining differences in glycolytic rates between normal and malignant tissues initiated literally thousands of studies in which attempts were made to implicate enzymes in the malignant process. These studies led to evaluation of glycolytic as well as other enzymes in malignant and normal tissues and in blood and other body fluids of patients with cancer. Despite these many studies, a cancer-specific enzyme has not yet been described. However, enzyme measurements in tissue, blood and body fluids have a major role in the management of patients with cancer. The purpose of paper is to review enzymes which have a traditional role in cancer enzymology and those which are still seeking a place in treatment protocols of cancer patients.

Key words: enzymes, tumor markers, body fluids, methodology

Literatura

- Gutman EB, Sproul EE, Gutman AB. Significance of increased phosphatase activity of bone at the site of osteoplastic metastases secondary to carcinoma of the prostate gland. *Am J Cancer* 1938; 28: 345–95.
- Chu TM. Prostate Specific Antigen. In: Sell S, ed. Serological cancer markers. Totowa NJ: Humana Press, 1992: 99–115.
- Diamandis EP. Prostate-specific antigen: Its usefulness in clinical medicine. *Trends Endocrinol Metal* 1998; 8: 310–16.
- Black MH, Diamandis EP. The diagnostic and prognostic utility of prostate-specific antigen for diseases of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 59: 1–14.
- Wenner CE. Progress in tumor enzymology. *Advan Enzymol* 1967; 29: 231–390.
- Schwartz MK. Laboratory aids to diagnostic-enzymes. *Cancer* 1976; 37: 542–48.
- Schwartz MK. Enzyme tests in cancer. *Clin Lab Med* 1990; 10: 27–31.
- Lehmann GF. Enzymes and Isoenzymes Diagnosis of Cancer. In: *Advances in Clinical Enzymology* (E. Schmidt et al, Eds.), S. Karger, Basel 1979; 171–195.
- Majkić-Singh N. *Klinička enzimologija*, DMBJ, Beograd, 1993.
- Weber G. Enzymology in cancer cells. Part 1. *N Engl J Med* 1977; 296: 486–540.
- Weber G. Enzymology in cancer cells. Part 2. *N Engl J Med* 1997; 296: 541–75.
- Swartz KM. Enzyme Tests in Malignant Disease. In: *Enzyme Tests in Diagnosis*. Ed by DW Moss and SB Rosalki, Oxford University Press, 1996; 189–214.
- Moss DW, Rosalki SB. *Enzyme Tests in Diagnosis*. Oxford University Press, 1996.
- Chan DW, Booth RA, Diamandis EP. Tumor Markers. In: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Eds. CA Burtis, ER Ashwood, DE Burns; Elsevier Saunders, 2006, 745–795.
- Fishman WH, Inglis NR, Stolbach LL, Krant MJ. A serum alkaline phosphatase isoenzymes of human neoplastic cell origin. *Cancer Res* 1968; 28: 150–54.
- Stigbrand T, Wahren B. Alkaline phosphatase as tumor markers. In: Sell S, Ed. *Serological cancer markers*. Totowa NJ: Humana Press, 1992: 135–49.
- Schwartz MK. Enzyme tests in cancer. *Clin Lab Med* 1982; 2: 479–91.
- Babaian RJ, Fritsche HA, Zhang Z, et al. Evaluation of PostASURE index in the detection of prostate cancer: a preliminary report. *Urology* 1998; 51: 132–36.
- Stamey TA, Barnhill SD, Thang Z, et al. Effectiveness of ProstateASURE in detecting prostate cancer and benign prostate hyperplasia in men age 50 or older. *J Urol* 1996; 155: 436A.
- Zeltzer PM, Marangos PJ, Evans AE, Schneider SL. Serum neuron-specific enolase in children with neuroblastoma. *Cancer* 1986; 57: 1230–34.
- Rubenstein M, Guinan PD, McKiel CF, Dubin A. Review of acid phosphatase in the diagnosis and prognosis of prostatic cancer. *Clin Physiol Biochem* 1988; 6: 41–52.
- Andriole GL, Catalona WJ. The diagnosis and treatment of prostate cancer. *Ann Rev Med* 1991; 42: 9–15.
- Bunting PS. Is there still a role for prostatic acid phosphatase? CSCC Position Statement. *Canadian Society of Clinical Chemists. Clin Biochem* 1999; 32: 591–94.
- Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, et al. Measurement of prostate specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med* 1991; 324: 1156–61.
- Chan DW, Sokoll Lj. Prostate-specific antigen: Advan-

- ces and challenges. (Editorial). Clin Chem 1999; 45: 755–56.
26. Duffy MJ. PSA as a marker for prostate cancer: a critical review. Ann Clin Biochem 1996; 33: 511–9.
27. Partin AW, Hanks GE, Klein EA, et al. Prostate-specific antigen as a marker of disease activity in prostate cancer. Oncology (Hunting) 2002; 16:1024–38.
28. Ferguson RA, Yu H, Kalyvas M, et al. Ultrasensitive detection of prostate-specific antigen by a time-resolved immunofluorometric assay and the Immulite immunoluminescent third-generation assay: potential applications in prostate and breast cancers. Clin Chem 1996; 42: 675–84.
29. Schedlich LJ, Bennetts BH, Morris BJ. Primary structure of a human glandular kallikrein gene. DNA 1987; 6: 429.
30. Lovgren J, Valtonen-Andre C, Marsal K, et al. Measurement of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 in different body fluids. J Androl 1999; 20: 348.
31. Darson MF, Pacelli A, Roche P, et al. Human glandular kallikrein 2 expression in prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. Urology 1999; 53: 939.
32. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen I, et al. The Urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. Int J Cancer 1997; 72: 1–22.
33. Duggan C, Maguire T, McDermott E, et al. Urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor in breast cancer. J Surg Oncol 1999; 1: 130–35.
34. Reuning U, Anagnostou T, Ravery V, et al. An artificial neural network to predict the outcome of repeat prostate biopsies. Urology 2003; 62: 456–60.
35. Rosenberg S. The Urokinase-type plasminogen activator system in cancer and other pathological conditions: introduction and perspective. Curr Pharm Des 2003; 9: 4.
36. Duffy MJ, Maguire TM, McDermott EW, et al. Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple types of cancer. J Surg Oncol 1999; 1: 130–35.
37. Koblinski JE, Ahram M, Sloane BF. Unraveling the role of proteases in cancer. Clin Chim Acta 2000; 291 (2):1 13–35.
38. Overall CM, Lopez-Otin C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. Nat Rev Cancer 2002; 2: 657–72.
39. Vihinen P, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. Int J Cancer 2002; 99: 157–23.
40. Stenman UH. Tumor-associated trypsin inhibitor. Clin Chem 2002; 8: 1206–09.
41. Hiyama E, Hiyama K. Telomerase as tumor marker. Cancer Lett 2003; 94: 221–33.
42. Lehman GH. Enzyme and Isoenzymes Diagnosis of Cancer, In: Advances in Clinical Enzymology (E. Schmidt et al, eds), S. Karger, Basel, 2979; 171–195.
43. Schwartz MK, Fleisher M. Diagnostic biochemical methods in pancreatic disease. Adv Clin Chem 1970; 11: 113–59.
44. Majkić-Singh, N et al. Diagnostic significance of enzyme-immunoassay for the measurement of prostatic acid phosphatase. Acta Pharm Jugoslav 1985; 35: 23–30.
45. Bardwill C, Change C. Serum lactic dehydrogenase, leucine aminopeptidase and 5'-nucleotidase activities. Observation in patients with carcinoma of the pancreas and hepatobiliary disease. Can Med Ass J 1963; 89: 755–61.
46. Munjal D, Goldenberger DM. Carcinoembryonic antigen and glucose phosphate isomerase in human colonic cancer model (GW-39). Br J Cancer 1976; 34: 227–32.
47. Fishman WH. Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes. Am J Med 1974; 56: 617–42.
48. Yam LT. Clinical significance of the human acid phosphatase. A review. Am J Med 1974; 56: 604–16.
49. Bayalin SB et al. Elevated histaminase activity in medullary carcinoma of the thyroid gland. New Engl J Med 1970; 293: 1239–44.

Rad primljen: 28. 02. 2006

Prihvaćen za štampu: 25. 03. 2006