

Mezotelin – nový biomarker v diagnostice mezoteliomu pleury

P. Jakubec, I. Grygárková,
V. Kolek, K. Cwiertka,
M. Kapustová

ÚVOD

Mezoteliom je vysoce agresivní nádor serozních blan, který se může objevit na pleuře, peritoneu, perikardu, tunica vaginalis testis a ovariálním epitelu. Histologicky se mezoteliom dělí na tři typy: epiteloidní, sarkomatoidní a smíšený. Až 75-80 % všech případů vzniká v pohrudniční dutině, což z něho činí nejčastější primární nádor pleury. Mezoteliom je vzácný nádor a tvoří asi jen 0,1-0,2 % všech nádorů. Incidence mezoteliomu je odhadována na 1-6,6 případů/100 000 obyvatel u mužů a 0,1-2,5 případů /100 000 obyvatel u žen a je příčinou asi 15 000-20 000 úmrtí ročně v celosvětovém měřítku. Incidence mezoteliomu byla v České republice v roce 2005 0,8 případů/100 000 obyvatel u mužů a 0,3 případů /100 000 obyvatel u žen. Celosvětově se v následujících dvou dekáдах očekává výrazný nárůst případů mezoteliomu pleury. Hlavní příčinným faktorem tohoto onemocnění je expozice azbestu, kterou lze zjistit u 80-90 % nemocných. Typickým znakem je dlouhá doba latence mezi expozicí azbestu a vznikem onemocnění, která se pohybuje mezi 20 až 60 lety. Expozice azbestu je hlavně profesionální u zaměstnanců pracujících s azbestem, ale existuje i neprofesionální expozice u rodinných příslušníků zaměstnanců a lidí žijících v okolí závodů zpracovávajících azbest. Jiným významným faktorem je pravděpodobně opičí virus SV40. Jeho T-antigen je nalézán asi u poloviny případů mezoteliomů v USA a kombinace infekce virem SV40 s expozicí azbestu může významně zvyšovat riziko vzniku mezoteliomu oproti samotné expozici azbestu. V minulosti byla častým zdrojem SV40 kontaminovaná vakcína proti poliomyelitidě, která byla vyráběna z buněčných kultur vycházejících z tkáně opičích ledvin a jednalo se hlavně o oblast východní Evropy a Asie. Mimo tyto faktory se v etiopatogenezi mezoteliomu uplatňují materiály podobné azbestu (erionit), depozice částic emitujících alfa záření jako ionizující záření či thorotrast a také dosud blíže neobjasněné genetické abnormality, pro což svědčí existence „vysoce rizikových“ rodin v Turecku, Kanadě a USA.

Prognóza mezoteliomu je obvykle špatná a medián přežití se pohybuje okolo 12 měsíců při podávání moderní chemoterapie. Příčinou je většinou pozdní diagnostika mezoteliomu v pokročilém stadiu nemoci a poměrně vysoká rezistence tumoru na radioterapii a chemoterapii. Předpokládá se, že zlepšení diagnostiky se záchytem nemoci v časném stadiu by vedlo k prodloužení přežití a zlepšení prognózy nemocných. V současné době v klinické praxi neexistuje rutinně používaný sérový marker mezoteliomu. V posledních letech byly objeveny nové biomarkery, jejichž benefit v diagnostice mezoteliomu pleury je intenzivně studován. Jde o mezotelin, megakaryocyty potencující faktor (MPF) a osteopontin. Tyto biomarkery by mohly mít své místo jednak v časně diagnostice mezoteliomu pleury, ale i jako pomocné markery v diferenciální diagnostice pleurálních výpotků.

V Olomouckém kraji bylo v minulosti činných několik továren zpracovávajících azbest a díky tomu je v tomto regionu dlouhodobě vyšší výskyt mezoteliomů. První klinickým příznakem mezoteliomu byl u většiny případů chronický pleurální výpotek. Proto jsme se rozhodli v rámci diagnostiky chronických pleurálních výpotků vyšetřovat solubilní mezotelin a zjistit jeho klinický význam v detekci mezoteliomu pleury.

MEZOTELIN

Mezotelin byl poprvé identifikován v roce 1992 a svůj název získal v roce 1996. Lidský gen pro mezotelin je uložen na 16. chromozómu (lokus 16p13.3) a sousedí s lokusem tumor supresního genu Tsc2. Primárním produktem genu je prekurzorový protein s molekulovou hmotností 71 000. Tento prekurzor je štěpen proteázou podobnou furinu na dvě komponenty. První je N-terminální fragment s Mr 31 000, tzv. megakaryocyty potencující faktor (MPF), který je uvolňován do krve. Druhý je C-terminální fragment s Mr 40 000, což je samotný mezotelin vázaný v buněčné membráně.

Mezotelin je glykoprotein, který je za fyziologických okolností pevně vázán pomocí glykosylfosfatidylinositolu v buněčné membráně normálních mezotelových buněk.

Předpokládá se, že hraje roli v adhezivních dějích, rozpoznávání a signalizaci mezi buňkami. K jeho hyperexpresi dochází u řady nádorových procesů, nejčastěji u mezoteliomu, méně často u karcinomu ovaria, pankreatu a plic (zvláště adenokarcinomů), vzácně u karcinomu prsu, tlustého střeva, endometria, ledvin a sarkomů. Ačkoliv je mezotelin pevně vázán v buněčné membráně, dochází v určitých situacích k uvolňování mezotelinu resp. jeho fragmentů

do tělesných tekutin, kde může být zjištěn jako tzv. solubilní mezotelin nebo také solubilní proteiny příbuzné mezotelinu (soluble mesothelin-related proteins, SMRP). Existují tři různé varianty těchto proteinů – mezotelin 1, který je nejčastější, varianty 2 a 3 jsou vzácnější. Varianty mezotelin 1 a mezotelin 2 (lišící se od varianty 1 jen v osmi aminokyselinách) vznikají proteolytickým odštěpením části molekuly membránového mezotelinu, pravděpodobně působením některé fosfolipázy nebo proteázy. Varianta mezotelin 3 (v některých textech uváděna též pod synonymem SMRP) vzniká genovou mutací mezotelinového genu a má identickou N-terminální část, ale odlišnou C-terminální část ve srovnání s fyziologickým mezotelinem. Zvýšení SMRP je nalézáno často u mezoteliomů, zvláště epiteloidního typu, méně často u karcinomu pankreatu, ovaria a plic. Sérový SMRP může být mírně až středně zvýšen i v benigních případech jako jsou osoby v expozici azbestu, a rovněž při arteriální hypertenzi, městnavém srdečním selhání či renální insuficienci.

Megakaryocyty potencující faktor (MPF) o Mr 31 000 je sekreční část společného mezotelinového prekurzoru. U myši stimuluje aktivitu interleukinu-3 k formování megakaryocytárních shluků. Jeho funkce v lidském organismu není dosud poznána.

Osteopontin o Mr 44 000 je extracelulární glykoprotein produkovaný mnoha různými typy buněk – osteoblasty, osteoklasty, epitelialními buňkami kůže, prsu, ledvin, buňkami endotelu, nervového systému a imunitního systému (T lymfocyty, natural killers, makrofágy). V lidském organismu má řadu funkcí. Je složkou neminerální kostní matrix, účastní se adhezivních i migračních dějů a je klíčovým cytokinem v mediaci I. typu imunitní reakce. Na druhé straně hraje roli v růstu, prorůstání a metastázování u maligních procesů. Zvýšená sérová hladina osteopontinu je nalézána u řady malignit, kromě mezoteliomu i u karcinomu prsu, ovaria, plic, prostaty, jícnu, žaludku, pankreatu, střeva a u sarkomů. Jeho zvýšení je ale popisováno také u pleurálních výpotků při řadě nenádorových onemocnění jako tuberkulóza, intersticiální pneumonie, ischemická choroba srdeční a další. Problémem validity vyšetření osteopontinu je jeho proteolýza trombinem, což může vést k falešně negativním výsledkům. Všechny výše uvedené skutečnosti tak snižují výtěžnost vyšetření osteopontinu v diagnostice mezoteliomu.

VMYŠETŘOVACÍ TEST MESOMARK

K vyšetření solubilního mezotelinu (SMRP) se používá dvoustupňový imunoenzymový (ELISA) test MESOMARK, který využívá dvojice monoklonálních protilátek. První protilátka 4H3 váže solubilní

mezotelin varianty 1,2 a 3, druhá protilátka OV569 vazbou detekuje solubilní mezotelin varianty 1 a 3. Za barevné změny je odpovědný tetrametylbenzidin (TMB), který v peroxidázové reakci poskytuje modré zbarvení, a to se účinkem „stop“ roztoku (1% kyseliny chlorovodíkové) mění na žlutou barvu, která se stanovuje spektrofotometricky. Komerční souprava MESOMARK obsahuje koncentrovaný promývací pufr, substrát TMB v pufru, „stop“ roztok – 1% HCl, mikrotitrační destičku potaženou monoklonální protilátkou 4H3, konjugát monoklonální protilátky OV569 s křenovou peroxidázou, diluent – PBS pufr s boviním sérem a kalibrátory A až F o koncentracích 0 až 32 nmol/l. Séra vyšetřovaných jedinců se ředí ředicím roztokem v poměru 1:100. Poté se pipetuje po 100 µl kalibrátorů, kontrol a vyšetřovaných sér do jednotlivých jamek v mikrotitrační plotně a směs se inkubuje při pokojové teplotě 60 minut s protřepáváním. Následuje pětinasobné promytí 350 µl promývacího roztoku. Pak se do každé jamky přidává 100 µl konjugátu monoklonální protilátky OV569, inkubuje se dalších 60 minut v temnu s protřepáváním plotny a v závěru se opět pětkrát promývá 350 µl promývacího roztoku. Následně se do každé jamky pipetuje 100 µl substrátu TMB a inkubuje se 15 minut v temnu s protřepáváním. Nakonec se reakce zastavuje přidáním 100 µl „stop“ roztoku HCl do každé jamky a jemně se protřepe. Vzorky a standardy se měří spektrofotometricky při 450 nm. Minimální detekční limit vyšetření je 0,16 nmol/l, 99. percentil referenční skupiny je 1,5 nmol/l. V reakci neinterferují bilirubin, hemoglobin, triacylglyceroly ani cytostatika (gemcitabin, pemetrexed, carboplatina, cisplatina). SMRP zůstává stabilní ve zmraženém vzorku séra i po dobu několika let.

SOUBOR A METODIKA

Soubor tvořilo 59 nemocných, kteří byli vyšetřováni od února 2008 do října 2009 pro chronický exsudativní pleurální výpotek nejasné etiologie. Jednalo se o 30 mužů a 29 žen ve věkovém rozmezí 39 až 97 let (průměrný věk 65,1 roku). Všem byl odebrán vzorek séra k vyšetření SMRP. U pacientů byla histologicky verifikována definitivní diagnóza pleurálního postižení a pacienti byly podle morfologické diagnózy rozděleny do tří skupin – maligní mezoteliomy pleury s podskupinami epiteloidního + smíšeného typu a sarkomatoidního typu, sekundární maligní postižení pleury a benigní postižení pleury. Ve vzorcích séra byla pomocí testu MESOMARK vyšetřena hladina SMRP. Jako cut off hodnota bylo zvoleno 1,5 nmol/litr. Dle výsledku pak byly vzorky rozděleny na skupinu pozitivních a negativních a ke každému vzorku byla přiřazena diagnóza pleurální-

ho výpotku. Nakonec byly vypočítány senzitivita, specifická, pozitivní prediktivní hodnota, negativní prediktivní hodnota a přesnost SMRP pro jednotlivé skupiny výpotků - maligní mezoteliomy pleury celkově, podskupinu epiteloidního + smíšeného typu maligního mezoteliomu, všechna maligní postižení pleury a sekundární maligní postižení pleury.

VÝSLEDKY

Histologicky bylo diagnostikováno 20 mezoteliomů, z toho 16 epiteloidního nebo smíšeného typu (14 epiteloidních a 2 smíšené) a 4 sarkomatoidního typu. V dalších 27 případech šlo o jiná maligní postižení pleury - 15x bronchogenní karcinom, 4x karcinom prsu, 3x karcinom pankreatu, po jednom případě karcinom jater, žlučníku, endometria, thymom a maligní solitární fibrózní tumor pleury. Ve 12 případech se jednalo o benigní postižení pohrudnice - 3x hyalinózu pleury (2x pozitivní nález expozice azbestu), 9x chronický fibrózní zánět pleury.

Výsledek sérového SMRP byl pozitivní (> 1,5 nmol/l) v 16 případech, 12x šlo o mezoteliom (všechny případy histologicky epiteloidního nebo smíšeného typu), 2x bronchogenní karcinom (1x adenokarcinom, 1x spinocelulární karcinom), 1x karcinom prsu a 1x karcinom pankreatu. Čtyřicet tři výsledků bylo negativních. Z toho se v 31 případech jednalo o malignitu - 8x mezoteliom (4x epiteloidní nebo smíšený typ, 4x sarkomatoidní typ), 13x bronchogenní karcinom, 3x karcinom prsu, 2x karcinom pankreatu, po jednom případě karcinom jater, žlučníku, endometria, thymom a maligní solitární fibrózní tumor pleury. Negativní byly i všechny výsledky vyšetření SMRP u benigních procesů (tab. č. 1). Senzitivitu, specifickou, pozitivní prediktivní hodnotu (PPH), negativní prediktivní hodnotu (NPH) a přesnost SMRP u jednotlivých morfologických diagnóz uvádí tab. 2.

DISKUSE A ZÁVĚR

První práce, která se zaměřila na možnou souvislost sérového mezotelinu a mezoteliomu pleury, byla v roce 2003 studie Robinsona a spol., která přinesla nadějně výsledky. Senzitivita sérového mezotelinu pro mezoteliom byla 84 %, specifická ve srovnání s osobami v expozici azbestu, nádory plic a jinými onemocněními pleury 83 %, 95 % resp. 100 %. Práce Schneidera a spol. srovnávala hodnoty sérového SMRP u mezoteliomu, karcinomu plic a azbestózy. Senzitivita a specifická SMRP pro mezoteliom byla 53,0 % a 82,7 % při cut-off 1,35 nmol/l.

Beyer a spol. uvádějí ve své studii při použití cut-off 1,5 nmol/l zvýšenou hodnotu sérového SMRP u 52 % mezoteliomů, 17 % plicních nádorů a 5 % osob v expozici azbestu.

Recentní španělská studie srovnávala hodnoty SMRP u skupin osob zdravých, osob v expozici azbestu bez nemoci nebo s benigním postižením a skupinu mezoteliomů. Nejvhodnější cut-off byla hodnota 0,55 nmol/l, při které byla senzitivita i specifická sérového mezotelinu pro mezoteliom 72,0 %. Italská práce Cristaudoa a spol. hodnotila hladiny sérového SMRP mezi mezoteliomy, karcinomem plic, benigními respiračními nemocemi a zdravými kontrolami. Při cut-off 1,0 nmol/l měl sérový mezotelin pro mezoteliom senzitivitu 68,2 % a specifickou 80,5 % ve srovnání s kontrolami. Specifická SMRP byla ve srovnání s benigními respiračními nemocemi 80,8 % a ve srovnání s karcinomy plic 68 %. Výsledky našeho souboru jsou srovnatelné s údaji v literatuře, včetně lepší výtěžnosti tohoto vyšetření ve skupině epiteloidních mezoteliomů.

Scherpereel a spol. vyšetřovali hladiny sérového a pleurálního mezotelinu u skupin osob s mezoteliomem, metastatickým nádorovým postižením pleury a benigním postižením pleury po expozici azbestu. Sérový SMRP měl při cut-off 1,1 nmol/l senzitivitu a specifickou pro mezoteliom oproti zbývajícím skupinám 71,7 % a 69,8 %, u pleurálního SMRP při cut-off 20,8 nmol/l to bylo 65,1 % a 83,7 %. V obdobné americké studii Passe a spol. byla senzitivita a specifická sérového mezotelinu pro mezoteliom při cut-off 1,075 nmol/l 81,1 % a 87,1 %, pro pleurální mezotelin při cut-off 12,6 nmol/l to byly hodnoty 75,6 % a 82,0 %. Recentní práce hodnotící pouze pleurální SMRP prokázala výrazně vyšší medián SMRP u skupiny mezoteliomu, kde dosahoval hodnoty 40,3 nmol/l, naproti tomu u metastatického postižení pleury byl medián jen 6,1 nmol/l a u benigních pleurálních výpotků 3,7 nmol/l. Při cut-off 20,0 nmol/l měl pleurální SMRP pro mezoteliom senzitivitu 71 % při specifické 89 %, zatímco cytologické vyšetření výpotku mělo senzitivitu 35 % při specifické 100 %.

Ve studii srovnávající výtěžnost tří nových biomarkerů v diagnostice mezoteliomu měl při společné specifické 95 % nejlepší senzitivitu SMRP - 75 %, osteopontin pouze 47 % a megakaryocyty potenciální faktor /MPF/ dokonce jen 34 %. Japonská studie srovnávající MPF a SMRP ale dospěla k odlišným údajům. MPF měl v diagnostice mezoteliomu pleury senzitivitu 74,1 % a specifickou 90,4 %, zatímco SMRP 59,3 % a 86,2 %. Onda a spol. našli dokonce zvýšenou hladinu MPF u 91 % (51 z 56) osob s mezoteliomem a u několika osob i výrazný pokles MPF po chirurgickém zmenšení tumoru. Samotný osteopontin dokáže podle jedné práce odlišit pacienty s mezoteliomem pleury oproti zdravým osobám v expozici azbestu, ale neodliší pacienty s mezoteli-

omem od osob s benigním azbestovým postižením pleury či metastatickým nádorovým postižením pohrudnice a jeho výtěžnost proti SMRP je nižší. Existují i práce, které srovnávaly SMRP a klasické tumormarkery v diagnostice mezoteliomu pleury. Creaney a spol. vyšetřovali SMRP a CA125. Při společné specifitě 95 % měl lepší výtěžnost SMRP se senzitivitou 52 % proti 27% senzitivitě CA125. V komplexní studii srovnávající výtěžnost SMRP, CYFRA 21-1 a CEA se u pleurálních malignit jevil jako nejlepší marker v odlišení malignit od zdravých kontrol tumormarker CYFRA 21-1. Naopak kombinace SMRP a CEA byla nejpřesnější v odlišení mezoteliomu od nemalobuněčného karcinomu plic s úspěšností 85 %.

Většina prací prokazuje vyšší hodnoty SMRP u epiteloidního mezoteliomu než u jiných typů mezoteliomu. I v našem souboru byla senzitivita, specifita, negativní prediktivní hodnota a přesnost sérového mezotelinu epiteloidních mezoteliomů vyšší než u skupiny všech mezoteliomů. Předpokládá se, že hladina sérového SMRP přímo koreluje s množstvím epiteliální komponenty v tumoru.

Uvádí se, že s růstem tumoru roste i hodnota sérového mezotelinu, naopak chirurgické zmenšení tumoru vede ke snížení hladiny SMRP. Ojedinelé práce uvádějí, že vyšetření SMRP se nezdá být užitečné v diagnostice mezoteliomu pleury, zvláště v časném stadiu nemoci, kdy je jeho senzitivita jen

kolem 50 %. Velká většina prací se ale kloní k názoru, že sérový mezotelin může hrát roli v diagnostice a jeho zvýšení je suspektní pro malignitu, obzvláště pro mezoteliom. Toto potvrzují i výsledky našeho souboru, kde byly zvýšené hodnoty SMRP nad 1,5 nmol/l nalezeny jen u případů, kde definitivní diagnózou bylo primární nebo sekundární maligní postižení pleury.

Není vyloučen ani možný prediktivní efekt SMRP, jak uvádí studie Robinsona a spol, kde u tří ze sedmi zdravých osob v expozici azbestu se zvýšenou hodnotou solubilního mezoteliomu byl v následujících pěti letech sledování diagnostikován mezoteliom pleury. Řada prací uvádí zvýšený SMRP jako jeden z nezávislých prognostických faktorů mezoteliomu. Další slibnou oblastí, kde se vyšetřování sérového mezotelinu může uplatnit, je monitorace progresu mezoteliomu a jeho odpovědi na léčbu.

Závěrem lze říci, že solubilní mezotelin je potenciálně slibný biomarker v diagnostice maligního mezoteliomu, sledování progresu této nemoci a odpovědi na léčbu. Dle dosavadních výsledků by mohl být i pomocným markerem v diferenciální diagnostice pleurálních výpotků, zvláště maligní etiologie. K definitivnímu rozhodnutí ohledně jeho zařazení do běžných diagnostických postupů jsou ale nutné další rozsáhlé studie.

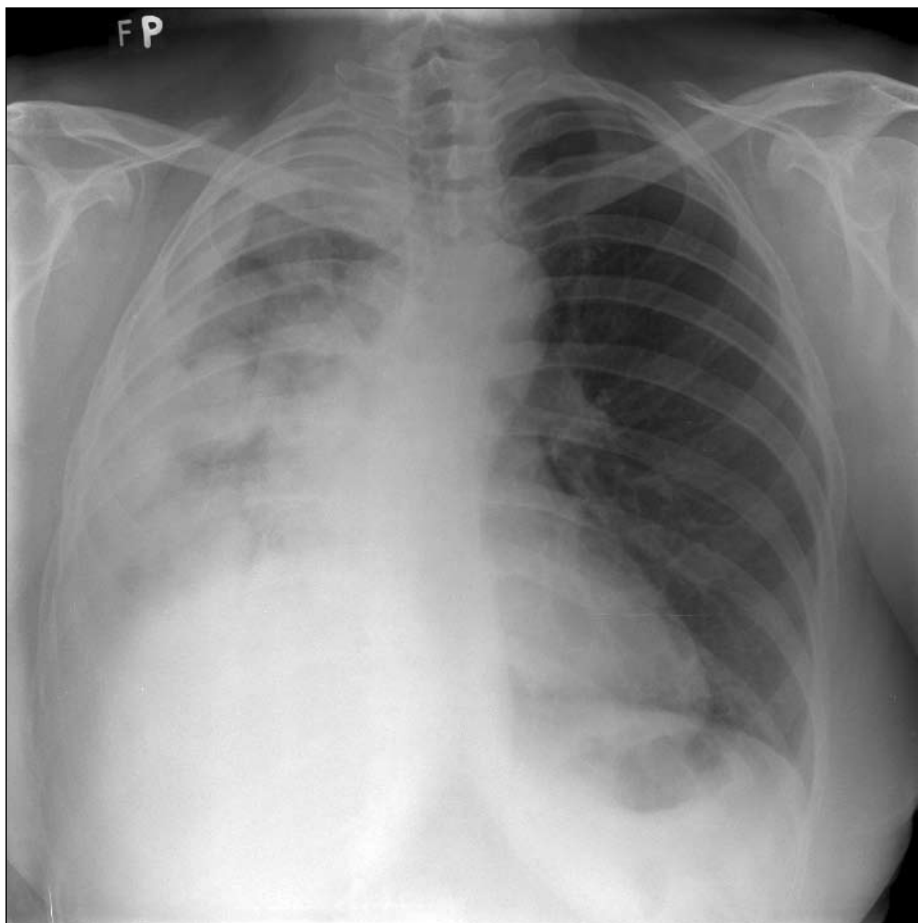
(Literatura u autora)

Tab.1: Hodnoty SMRP u jednotlivých morfologických diagnóz

SMRP	Mezoteliom	Jiné malignity	Benigní procesy
Pozitivní	Celkem 12 (všechny epiteloidní + smíšené)	Celkem 4 Ca bronchogenes 2 Ca prsu 1 Ca pankreatu 1	
Negativní	Celkem 8 (4 epiteloidní + smíšené, 4 sarkomatoidní)	Celkem 31 Ca bronchogenes 13 Ca prsu 3 Ca pankreatu 2 Ca jater 1 Ca žlučníku 1 Ca endometria 1 Thymom 1 Maligní solitární fibrozní tumor pleury 1	Celkem 12 Hyalinóza pleury 3 Chronický zánět 9

Tab. 2: Senzitivita a specificita, PPH, NPH a přesnost SMRP u jednotlivých morfologických diagnóz

	Všechny mezoteliomy	Mezoteliomy epit. a smíš.	Malignity mimo mezoteliom	Všechny malignity
Senzitivita	60,0 %	75,0 %	14,8 %	34,0 %
Specificita	89,7 %	90,7 %	62,5 %	100 %
PPH	75 %	75 %	25 %	100 %
NPH	81,4 %	90,7 %	46,5 %	27,9 %
Přesnost	79,7 %	86,4 %	40,7 %	47,5 %



Obr. 1: RTG hrudníku - rozsáhlé postižení pravého hemitoraxu mezoteliomem



Obr. 2: RTG hrudníku - mezoteliom uložený nástěnně na parietální pleuře vlevo (šipka)



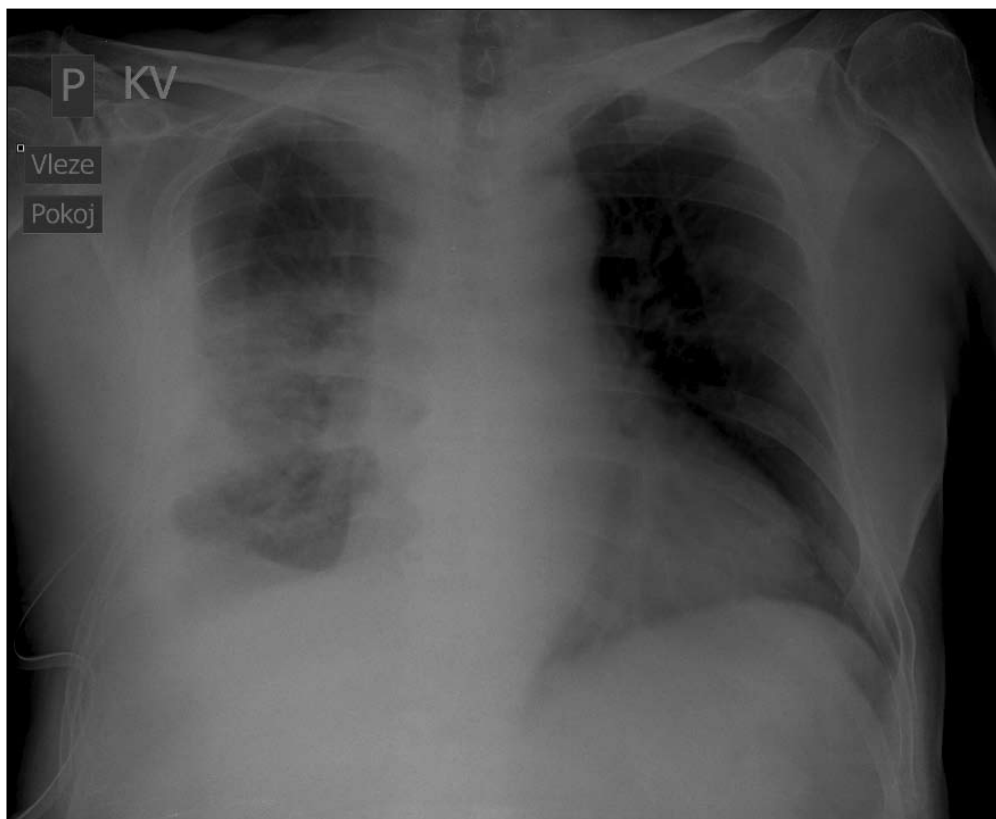
Obr. 3: CT hrudníku - rozsáhlý fluidotorax u mezoteliomu pleury vpravo



Obr. 4: CT hrudníku – difuzní postižení parietální pleury vpravo mezoteliomem



Obr. 5: PET/CT vyšetření - difuzní postižení parietální pleury vpravo mezoteliomem



Obr. 6: RTG hrudníku - paliativní léčba pravostranného fluidotoraxu u mezoteliomu pleury – hrudní drenáž