

Received: 2006.12.06
Accepted: 2007.04.18
Published: 2007.05.18

Molekularne markery mikroprzerzutów we krwi pacjentów chorych na raka wątrobowokomórkowego

Molecular markers of micrometastasis in the blood of hepatocellular carcinoma patients

Anna Stokowska¹, Piotr Stalke², Krzysztof Piotr Bielawski¹

¹ Pracownia Diagnostyki Molekularnej, Katedra Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytet Gdański-Akademia Medyczna w Gdańsku,

² Klinika Chorób Zakaźnych, Akademia Medyczna w Gdańsku

Streszczenie

Jednym z ważniejszych problemów terapeutycznych raka wątrobowokomórkowego jest częste występowanie przerzutów w następstwie hematogennej drogi rozprzestrzeniania się komórek z guza pierwotnego. Standardowe obrazowe metody diagnostyczne nie pozwalają na odpowiednio wczesne wykrycie nawrotu choroby. Natomiast analiza molekularnych markerów komórek, oparta zwłaszcza na analizie mRNA w próbkach krwi obwodowej metodą RT-PCR, teoretycznie umożliwia znajdowanie pojedynczych mikroprzerzutów. Ze względu na swoistość dla raka wątrobowokomórkowego (HCC) analiza ekspresji alfafetoproteiny jest przyjmowana za „złoty standard” w diagnostyce HCC zarówno na poziomie ekspresji białka, jak i mRNA. Opracowanie protokołu analizy nastęca jednak wiele kłopotów, a przydatność tego markera do monitoringu statusu chorego w okresie okołoperacyjnym jest kwestionowana. Obecnie trwają poszukiwania nowych swoistych markerów HCC, zarówno wśród tych ściśle wątrobowych, jak i charakterystycznych jednocześnie dla różnych nowotworów. Badane są również markery związane z oznaczeniem swobodnie krążących kwasów nukleinowych, w tym ich ilościowe oznaczenie. Szansą na uzyskanie zadowalających wyników swoistości testów może być połączenie oznaczeń kilku różnych markerów obecności komórek nowotworowych we krwi.

Słowa kluczowe:

rak wątrobowokomórkowy (HCC) • molekularne markery nowotworowe • RT-PCR • AFP mRNA • krew obwodowa

Summary

The frequent occurrence of metastases from the primary tumor present a major therapeutic problem in hepatocellular cancer because of the hematogenous spread of cancer cells. Standard imaging diagnostics methods do not allow for an early detection of relapse of the disease, as opposed to the analysis of molecular cell markers, especially mRNA-based methods, in peripheral blood samples by RT-PCR. Analysis of alfafetoprotein expression is the “gold standard” in the diagnostics of HCC at the protein and mRNA level because of its specificity for liver cancer. However, working out an analysis protocol is problematic and the utility of the marker in monitoring a patient’s status in the perioperative period remains controversial. New HCC markers are being searched for among the highly liver-specific ones and those shared between various cancers types. Markers associated with freely circulating nucleic acids are also studied and quantitative assays are used. An assay for several markers simultaneously could give satisfactory results.

Key words:

hepatocellular carcinoma (HCC) • molecular tumor markers • RT-PCR • AFP mRNA • peripheral blood • circulating tumor cells

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/10479.pdf**Word count:** 3907**Tables:** 1**Figures:** 2**References:** 89**Adres autora:** dr hab. Krzysztof Piotr Bielawski, prof. UG, Pracownia Diagnostyki Molekularnej, Katedra Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; e-mail: bielawski@biotech.ug.gda.pl

WPROWADZENIE

Pierwotny rak wątroby jest piątą w kolejności nowotworową przyczyną śmierci na świecie, a najczęstszą jego postacią jest rak wątrobowokomórkowy (hepatocellular carcinoma - HCC) [26]. Do ważniejszych czynników etiologicznych sprzyjających rozwojowi tego guza zalicza się przewlekłe miażdżowe choroby wątroby (zwłaszcza zakażenia wirusami hepatotropowymi HBV, HCV, a także hemochromatozę) oraz spożywanie żywności zanieczyszczonej aflatoksynami. Obszary endemii HCC w znacznej mierze pokrywają się z obszarami endemii zakażeń wirusami HBV i HCV [4]. Polska należy do grupy krajów o umiarkowanym współczynniku zapadalności na HCC. W 2003 r. odnotowano 1969 zgonów (1047 wśród mężczyzn i 922 wśród kobiet) z powodu HCC, co stanowiło 4,7% zgonów wywołanych chorobą nowotworową. Ponadto, tego samego roku zarejestrowano 1559 nowych przypadków zachorowań na HCC (813 wśród mężczyzn i 746 wśród kobiet) [78]. Najskuteczniejszą metodą leczenia tego nowotworu nadal pozostaje resekcja segmentów lub płata wątroby, jednak u około 70% pacjentów poddanych leczeniu dochodzi do wznowy w ciągu pierwszych 3 lat od zabiegu [24]. Standardowe metody diagnostyczne, wykorzystujące techniki obrazowe, nie pozwalają na odpowiednio wczesne wykrycie nawrotu choroby, co skutkuje tym, że nawet zastosowanie agresywnej terapii jest nieskuteczne ze względu na wznowę miejscową lub pojawienie się odległych przerzutów.

Obserwacje często powstających ognisk przerzutowych w przeszczepianej wątrobie doprowadziły do przypuszczenia, że komórki nowotworowe mogą się rozprzestrzenić poza wątrobę drogą krążenia krwi spontanicznie lub jako konsekwencja inwazyjnych, jatrogennych procedur i mogą stanowić zaczątki mikroprzerzutów [57]. Z tego też względu stały się one celem diagnostycznym w monito-

ringu MRD (minimal residual disease, minimalnej choroby resztkowej), a dostępność krwi obwodowej i niewielka inwazyjność tej metody mogą ją uczynić techniką stosowaną z wyboru. Pomocna okazuje się tu analiza markerów, a więc genów lub ich produktów pojawiających się w komórce w przebiegu choroby. Technologia przeciwciał monoklonalnych (mAbs) pozwala na czułe i swoiste oznaczenia białek metodami immunohistochemii (IHC) czy cytometrii przepływowej, jednak pracochłonność i wysokie koszty tych metod dyskwalifikują je jako potencjalne rutynowe badania przesiewowe.

Molekularne markery komórek nowotworowych oznaczane w próbkach krwi obwodowej pozwalają na względnie tanią i bezinwazyjną wczesną diagnozę w grupie ryzyka oraz rutynową ocenę skuteczności terapii. Jednakże obecnie wciąż brak jest w powszechnej praktyce medycznej zatwierdzonego markera dla HCC. Ze względu na wysoką czułość technik łańcuchowej reakcji polimerazy (polymerase chain reaction – PCR) możliwe stało się wykrywanie z użyciem RT-PCR pojedynczych krążących we krwi komórek nowotworowych (circulating tumor cells – CTC). Markery oparte na oznaczeniu mRNA metodą PCR z użyciem odwrotnej transkryptazy (reverse transcriptase polymerase chain reaction – RT-PCR) pozwalają określić stopień ekspresji genu oraz wykryć różnice wynikające z alternatywnego składaniu eksonów.

Zaproponowana metoda ma kilka istotnych przewag w stosunku do oznaczeń opartych o analizę białek [17] (tabela 1).

W przypadku HCC wykazano, że mRNA albuminy i α -fetoproteiny mogą być potencjalnym markerem obecności rozprzestrzenionych w krwiobiegu komórek HCC [25,29]. Jednak duża liczba badań wykazuje, że markery te występują również w zdrowych hepatocytach, zatem ich użytecz-

Tabela 1. Zalety oznaczeń opartych na reakcji RT-PCR w porównaniu z analizą białek

1. RNA jest bardzo nietrwały w środowisku pozakomórkowym, dlatego jego wykrycie wskazuje jednoznacznie na obecność komórek nowotworowych w badanej tkance lub płynie ustrojowym
2. Tkankowoswoisty mRNA wskazuje często na obecność komórek mimo negatywnych wyników oznaczeń białkowych
3. Pomimo że testy z użyciem mAbs stają się coraz bardziej czułe, nie są jednak w stanie uwidoczniać pojedynczej komórki, co jest możliwe przy użyciu techniki PCR
4. Ocena ilościowa w IHC jest często subiektywna, podczas gdy np. analiza PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) jest znacznie dokładniejsza
5. Ponadto metoda ta jest mniej pracochłonna i relatywnie tania

ność w diagnostyce HCC pozostaje wciąż kontrowersyjna. Dlatego istnieje potrzeba poszukiwania innych lepszych markerów lub/i opracowania wiarygodnej metody ilościowego ich oznaczania.

MARKERY ŚCIŚLE SWOISTE WĄTROBOWO

α -fetoproteina

α -fetoproteina (AFP) to podstawowe białko surowicy krwi płodu o funkcji immunoregulacyjnej, wpływające na wzrost i proliferację komórki [70]. Białko to, będąc efektem dla NF κ B, stanowi jeden z mechanizmów powstania immunotolerancji w stosunku do komórek nowotworowych. Prawdopodobnie mechanizm ten jest zbliżony do sytuacji stanu ciąży, gdy rozwija się matczyzna tolerancja immunologiczna na rozwijający się w macicy płód. AFP jest typową onkofetoproteiną wykazującą swoistość dla tkanki wątrobowej, gdyż w hepatoblastomie, dziecięcym raku wątroby, obserwuje się jej wysoką ekspresję, prowadzoną przez przypominające embrionalne hepatoblasty komórki nowotworowe [23].

Przyczyna wznowienia ekspresji AFP w HCC, wyciszonej przez negatywny regulator transkrypcji w okresie płodowym, pozostaje nieznana. Znaczenie mogą tu mieć zmiany w substancji zewnątrzkomórkowej [1], czynniki epigenetyczne, tj. jony metali ciężkich działające poprzez indukcję białek stresowych A2/3 [9] lub inaktywacja białka p53 przez HBx (białko X wirusa HBV) skutkująca stymulacją ekspresji AFP [54].

Oznaczenia

Stężenie AFP w surowicy jest nadal uznawane za „złoty standard” w badaniach diagnostycznych HCC, a w guzach wydzielających jej znaczną ilość umożliwia ocenę doszczędności zabiegu operacyjnego. Po radykalnym zabiegu operacyjnym ponowne narastanie jej stężenia w surowicy może być czułym markerem wznowy procesu nowotworowego. Spośród trzech glikoizoforn tego białka uważa się, że frakcja AFP-L3 jest najlepszym wskaźnikiem stopnia zaawansowania nowotworu, w tym także obecności przerzutów odległych, niezależnie od rozmiaru guza czy całkowitego stężenia AFP w surowicy [34]. Jednak czułość i swoistość metod serologicznych są wciąż zbyt małe by wykryć mikroprzerzuty. Co więcej, obecne w surowicy białko nie wskazuje na występowanie w niej komórek nowotworowych, a jedynie na jego duże wytwarzanie przez guz lub intensywnie regenerujące hepatocyty. Alternatywą dla badań serologicznych stało się zaproponowane w 1994 r. przez Matsumurę i wsp. [39] oznaczenie poziomu mRNA dla AFP we krwi obwodowej metodą RT-PCR. W badaniu tym nie stwierdzono ekspresji genu *AFP* u zdrowych ochotników, podczas gdy połowa pacjentów chorych na HCC okazała się *AFP* mRNA-pozytywna, a wynik istotnie korelował z rozmiarem guza, stężeniem surowiczej α -fetoproteiny oraz obecnością pozawątrobowych przerzutów. Wysoki poziom mRNA dla AFP korespondował ze znacznym zaawansowaniem klinicznym w klasyfikacji TNM – stopień IV (TNM: **tumor** – guz (pierwotny), **nodus** – węzeł (chłonny), **metastases** – przerzuty odległe) oraz z częstszym występowaniem zakrzepicy żyły wrotnej [38].

Zastosowanie techniki tzw. „wewnętrznej” (nested) RT-PCR (w której druga para starterów wiąże się w obrębie produktu amplifikacji pierwszej pary, dając krótszy produkt) zwiększa czułość 10–100 razy w porównaniu do konwencjonalnego RT-PCR i pozwala wykryć 1–10 komórek HepG2 wśród leukocytów w 5 ml krwi [15]. Zastosowany przez Funaki i wsp. trzypostopniowy RT-PCR przypominający wewnętrzny PCR [14] w teście czułości, dawał pozytywny wynik amplifikacji nawet przy rozcieńczeniu 10^{-8} cDNA z komórek HuH7, co odpowiada możliwości wykrycia 1 komórki HuH7 w 1 ml krwi. W badaniu *in vivo*, czułość metody wynosiła 43% po drugim kroku, natomiast po trzecim wzrastała do 71%. Metoda ta została zaadaptowana do oznaczeń ilościowych z użyciem skonstruowanego kompetytora reakcji RT-PCR [16].

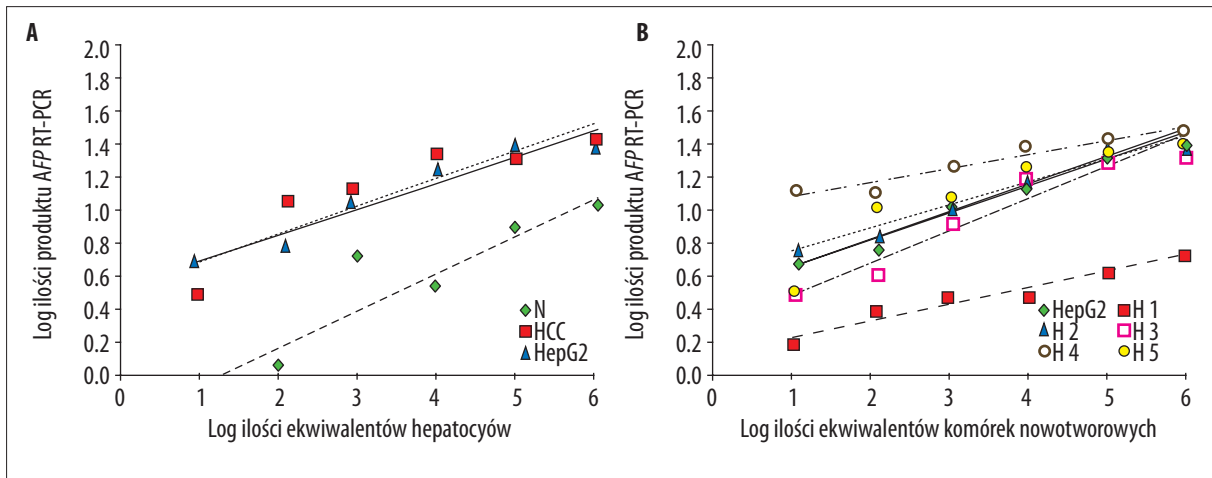
Opracowano również inne metody ilościowego oznaczania AFP mRNA we krwi obwodowej, np. poprzez określenie ilości produktu amplifikacji *AFP* mRNA w porównaniu do wartości uzyskiwanych dla określonych stężeń komórek hepatoblastoma (linia HepG2) [80]. Alternatywne podejście bazuje na włączeniu do analizy RT-PCR wewnętrznego standardu – mRNA dla GAPDH (dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerynowego), pozwalającego na normalizację wyników w zależności od liczby wszystkich jądrzastych komórek w próbce [37,43].

Problemy

Wciąż nierozwiązanym problemem pozostają wyniki fałszywie dodatnie uzyskiwane od pacjentów z ostrym lub przewlekłym uszkodzeniem wątroby, z cholangiocarcinoma (CCC) oraz w przypadku dokonanej marskości wątroby [39,85], których przyczyną może być obecność pewnych ilości transkryptu dla AFP w uszkodzonych [7], a nawet w prawidłowych krążących hepatocytach [2,79], choć w znacznie mniejszych ilościach niż w komórkach HCC. Liczne badania wykazują, że status pacjenta pod względem AFP mRNA może zmienić się z negatywnego na pozytywny po interwencji chirurgicznej na skutek jatrogenne uwolnienia hepatocytów do krwiobiegu [16, 36, 43]. Uwolnione mechanicznie hepatocyty mogą przebywać w krwiobiegu około 7 dni. Po tym okresie są one usuwane prawdopodobnie w wyniku reakcji układu immunologicznego [16, 56], dlatego określenie optymalnego czasu pobrania próbki, w celu monitorowania MRD po zabiegu, jest nadal kwestią sporną.

W przeciwieństwie do prezentowanych powyżej opinii Lemoine [32] oraz Witzigmann [77] nie wykazali korelacji między nawrotem choroby a poziomem *AFP* mRNA, niezależnie od czasu pobierania próbki do analizy, co może świadczyć o znacznej heterogeniczności ekspresji AFP, a także o niedoskonałości dostępnych metod.

Szansą na uzyskanie zadowalającej swoistości oznaczeń wydaje się zastosowanie analiz ilościowych. Wong zaproponowała metodę, opierającą się na stworzeniu krzywej kalibracyjnej dla każdej próbki pochodzącej od pacjenta, przedstawiającej w skali logarytmicznej stężenie AFP mRNA odpowiadające określonym liczbom komórek HCC danego pacjenta, zmieszanych z ustaloną liczbą jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (peripheral blood mononucleated cells – PBMNC) [79] (ryc. 1). W podob-



Ryc. 1. Krzywe kalibracyjne ilości produktu amplifikacji z użyciem ilościowego RT-PCR *AFP* mRNA. **A.** Symulację obecności komórek wątrobowych we krwi jednego pacjenta przeprowadzono przez zmieszanie ekwiwalentów liczby komórek guza (**HCC**), komórek tkanki nieobjętej nowotworem (**N**) oraz komórek wątrobiaka ludzkiego (**HepG2**) z 10^6 leukocytów. **B.** Krzywe kalibracyjne ilości *AFP* mRNA dla pięciu różnych pacjentów (**H1-H5**) i linii referencyjnej (HepG2). Na podstawie [25] (zmodyfikowano)

ny sposób można określić poziom *ALB* mRNA (gen albuminy), który odzwierciedla liczbę zdrowych hepatocytów krążących we krwi obwodowej i tym samym uniknąć generowanie wyników fałszywie dodatnich. Metoda ta jest jednak pracochłonna i inwazyjna, gdyż wymaga pobrania tkanki guza od pacjenta, co może mieć zastosowanie głównie przy monitorowaniu ryzyka wznowienia choroby po resekcji lub transplantacji wątroby.

Albumina

Albumina (*ALB*) należy do tej samej czterogenowej rodziny, co α -fetoproteina [51] jednak – w przeciwieństwie do *AFP* – jest wytwarzana przez tkankę wątroby noworodków i dorosłych. Kar i Carr użyli albuminy jako markera HCC wykorzystując amplifikacje za pomocą RT-PCR 3 i 4 eksonu genu *ALB* [25]. Próg czułości przez nich uzyskany wynosił 5 komórek Hep3B na 10^6 komórek MCF7. Choć autorzy ci nie uzyskali fałszywie pozytywnych wyników (prawdopodobnie z powodu małej czułości metody), to inne grupy wykazały obecność *ALB* mRNA (pochodzącego z prawidłowych hepatocytów) we krwi pacjentów z marskością i wirusowym zapaleniem wątroby [36] oraz u całkowicie zdrowych ochotników [6,39]. Było to najprawdopodobniej spowodowane zjawiskiem tzw. nieuprawnionej transkrypcji (illegitimate transcription) [3], umożliwiającej ekspresję na bardzo niskim poziomie właściwie każdego genu w komórce, a możliwe do wykazania tylko bardzo czułymi metodami. Źródłem pozytywnego sygnału amplifikacji mogą być leukocyty, które mogą zwiększyć znacząco ekspresję *ALB* po stymulacji mitogenami [45].

Paradoksalnie okazuje się, że ekspresja albuminy w komórkach linii HepG2 oraz w komórkach HCC jest wręcz obniżona względem odpowiadającej jej tkanki bez obecności nowotworu prawdopodobnie na rzecz uruchomienia ekspresji *AFP* [79]. Zatem poziom ekspresji *ALB* można odnieść raczej do liczby prawidłowych hepatocytów uwolnionych do krwi. Nie przesadza to o obecności krążących komórek nowotworowych, jednak może umożli-

wić ich kwantyfikację – o ile zostały zidentyfikowane na podstawie innego markera (np. *AFP*). Należy wziąć również pod uwagę dobór odpowiednich starterów, gdyż różne grupy badawcze badały amplifikacje PCR różnych eksonów genu *ALB*. Istotne jest też, iż znaczna homologia między genami *ALB* i *AFP* może spowodować uzyskanie fałszywie dodatnich wyników.

γ -glutamyl transpeptydaza (GGTP)

U zdrowych dorosłych GGTP jest wydzielana do krwi głównie przez wątrobowe komórki Kupffera oraz komórki śródbłonka przewodu żółciowego, a jej aktywność znacznie wzrasta w wątrobie płodowej i w tkankach z HCC [87]. Białko to występuje w 13 formach izoenzymatycznych, przy czym trzy z nich I', II, II' (nazwy frakcji uzyskanych przez elektroforezę w gradiencie stężenia żelu poliakrylamidowego) pojawiają się tylko u chorych na HCC, przez co ich stężenie w surowicy jest używane jako serologiczny marker diagnostyczny pierwotnego raka wątroby [60].

GGTP mRNA może być wykryty w tkance wątrobowej zdrowych dorosłych lub pacjentów z: HCC, niezłośliwymi dolegliwościami wątroby oraz wtórnym rakiem wątroby (ogniska przerzutowe do wątroby). Wyróżnia się trzy jego typy: płodowo-wątrobowy (typ A), HepG2 (typ B) oraz łożyskowy (typ C). Wszystkie trzy transkrypty dają białko o identycznej strukturze, a różnice w ich sekwencji znajdują się w niekodującym regionie 5', co sugeruje, iż powstawanie mRNA ludzkiej GGTP może być regulowane przez mechanizm alternatywnego składania genów w tym rejonie [58] lub może ono wywodzić się z różnych genów/pseudogenów.

Typ A jest dominujący w prawidłowej tkance wątrobowej, niezłośliwych hepatopatiach, łagodnych oraz wtórnych guzach (100%). W powyższych przypadkach typ C występuje w 25%, a typ B w ogóle się nie pojawia [19] lub występuje okazjonalnie (10–12,5%) [73]. Nie zaob-

serwowano znaczącej różnicy w dystrybucji powyższych typów mRNA między zdrowymi tkankami a tkankami dotkniętymi nienowotworowymi schorzeniami. Z kolei typ B znacznie częściej wykrywa się w przypadku HCC. W tkance guza występuje zawsze, przy obniżonej (około 50%) częstości występowania typu A, natomiast w tkance nieobjętej nowotworem, przylegającej do guza – przy 100% występowaniu typu A, typ B pojawia się w 87,5% [73]. Nowsze badania Hana z 2003 r. dały bardzo podobne wyniki, co potwierdza przydatność GTTP jako swoistego markera [19] również w przypadku oznaczeń w próbkach krwi obwodowej.

Badanie Sheena z 2003 r. wykazało, że obecność typu B GGTP mRNA w tkance z nowotworem koreluje z częstszym nawrotem choroby (63,6 *versus* 14,3% przy negatywnym wyniku). Obecność tego mRNA w tkance guza oraz tkance otaczającej, wolnej od nowotworu korelowała ze śmiertelnością w ciągu pięciu lat od zabiegu (odpowiednio – 45,5 *versus* 0% i 53,6 *versus* 0%) [63].

Częstość wykrywania wszystkich typów mRNA w komórkach z krwi obwodowej jest znacznie niższa niż w przypadku analizy tkanki z biopsji, co generuje pewną pulę wyników fałszywie ujemnych. Konieczne jest przeprowadzenie badań w większej grupie osób, zwłaszcza z pacjentami po interwencjach chirurgicznych oraz monitorowanie ewentualnej remisji choroby.

MARKERY PREFERENCYJNE DLA RAKA WĄTROBY (OBECNE RÓWNIEŻ W INNYCH NOWOTWORACH)

Insulinopodobny czynnik wzrostu typu II (IGF2)

Insulinopodobny czynnik wzrostu typu II (insulin-like growth factor) jest mitogennym polipeptydem spokrewnionym z insuliną, wydzielanym przez wiele organów płodowych. Gen *IGF2* charakteryzuje się skomplikowaną regulacją transkrypcji, czego konsekwencją jest występowanie czterech rodzajów jego mRNA, transkrybowanych z różnych promotorów [21]. Nadekspresja *IGF2* w tkance wątroby z nowotworem oraz ogniskach przednowotworowych jest dobrze udokumentowana zarówno w modelach zwierzęcych [61], jak i u ludzi w ognisku HCC [65]. Sygnalizacja ze strony IGF2 poprzez IGFRI stanowi zatem parakrynnny mechanizm stymulacji proliferacji hepatocytów. Przyczyną tego stanu jest przywrócenie płodowego wzoru transkrypcji *IGF2* na skutek aktywacji płodowoswoistych promotorów P2, P3 i P4 oraz utrata ekspresji z promotora P1, aktywnego w życiu dorosłym [74].

IGF2 bywa używany jako marker serologiczny, natomiast niewiele wiadomo o możliwości wykrywania komórek CTC z wykorzystaniem amplifikacji *IGF2* mRNA. Z badań Donga i wsp. wynika jednak, iż swoistość transkryptu *IGF2* dla komórek HCC obecnych we krwi jest duża, gdyż u zdrowych osób, jak i u pacjentów z różnymi nienowotworowymi dolegliwościami wątroby wynik oznaczeń był negatywny [8]. Czułość zastosowanej metody nested RT-PCR nie jest zadowalająca – poprawnie zdiagnozowano jedynie 34% chorych. Wykrywalność *IGF2* mRNA wzrasta jednak wraz ze stopniem zaawansowania choroby i sięga 100% w przypadku obecności pozawątrobowych przerzutów HCC.

Glipikan 3

Glipikan 3 (glypican 3 – GPC3) należy do rodziny siarczanowo-heparanowych proteoglikanów błonowych, które mogą być również wydzielane do krążenia [12]. Z powodu umiejscowienia w komórce molekułom tym przypisuje się rolę regulacji oddziaływań między czynnikami wzrostu a ich receptorami. GPC3 może więc wpływać na wzrost, różnicowanie i migrację komórek [11].

Mutacja genu *GPC3* jest główną przyczyną występowania syndromu Simpsona-Golabiego-Behmela, charakteryzującego się przerostem ciała oraz wieloma wrodzonymi wadami rozwojowymi, natomiast jego status w nowotworach jest zróżnicowany. W komórkach HCC, nowotworach przewodu pokarmowego i czerniaku [47] – rozwijających się z tkanek, w których GPC3 ulega ekspresji tylko w okresie embrionalnym, transformacji nowotworowej towarzyszy jego reekspresja. Zarówno analizy Northern-blot oraz hybridyzacja *in situ* [89], jak i mikromacierze oraz RT-PCR [48,68] wykazały, że ekspresja *GPC3* mRNA w hepatocytach jest bardzo mała, albo wręcz nieobecna w przypadku hiperplazji czy marskości, podczas gdy w 75–80% przypadków HCC jest zwiększona 5–10-krotnie w porównaniu ze zdrową tkanką otaczającą guz.

Opierając się na danych z analizy profili ekspresyjnych HCC i zdrowej tkanki z użyciem techniki mikromacierzy, zidentyfikowano często ulegający nadekspresji w przypadku nowotworu wątroby transkrypt *MXR7*, wykazujący 100% homologii z cDNA glipikanu 3 [30], a badania Zhou [88] wykazały analogiczny profil wykrywalności HCC, jak poprzednio przytoczone badania Nakatsury [48]. Sugeruje to tożsamość tych dwóch markerów.

Do tej pory przeprowadzono niewiele badań oceniających stopień ekspresji GPC3 w komórkach HCC techniką PCR. Jak dotąd nie sprawdzano również możliwości zastosowania powyższego markera w analizie komórek HCC we krwi obwodowej. Prawie 100% swoistość GPC3 dla HCC w porównaniu z łagodnymi dolegliwościami wątroby czyni go obiecującym markerem do wczesnej diagnostyki pierwotnego raka wątroby. Ekspresja GPC3 w komórkach innych nowotworów (np. czerniak, guz Wilmsa czy hepatoblastoma) może obniżyć swoistość diagnozy w badaniach przesiewowych [54].

MARKERY CHARAKTERYSTYCZNE DLA NOWOTWORU, MNIEJ SWOISTE DLA MIEJSCA POCHODZENIA

β1,4N-acetylgalaktozaminyltransferaza (GalNAT)

β1,4N-acetylgalaktozaminyltransferaza (GalNAcT) jest glikozylotransferazą zaangażowaną w syntezę gangliozydów GM2 i GD2 z ich prekursorów GM3 i GD3 [55], które odgrywają znaczącą rolę w rozwoju embrionalnym oraz w transformacji nowotworowej, szczególnie w przypadku nowotworów o pochodzeniu neuroektodermicznym [56, 57].

Sugita i wsp. [58] zbadali przydatność powyższego markera w badaniach diagnostycznych HCC. Bardzo wysoki odsetek (94%) HCC wykazywał metodą półilościowej RT-PCR ekspresję GalNAcT znacznie wyższą niż w ota-

czającej guz tkance wątroby. Ponadto *GalNacT* mRNA nie był wykrywany we krwi obwodowej zdrowych osób. Pozytywny wynik testu uzyskano za to u 5 z 14 pacjentów z HCC, przy czym u wszystkich rozwinęły się przerzuty w ciągu 2 lat od resekcji [58]. W całej badanej grupie tylko u jednego pacjenta z HCC wykazano ekspresję AFP oraz nie zaobserwowano w jego przypadku wznowy choroby. Analityczna czułość metody wynosiła 5 komórek HuH7 na 1 ml krwi zdrowego osobnika [58].

Negatywną stroną wykorzystania GalNacT jako markera jest częsta jej ekspresja w różnych typach nowotworów, szczególnie żołądka i piersi oraz stosunkowo mała czułość w badaniach *in vivo*. Potencjalnymi sposobami ulepszenia oznaczeń tego markera może być: optymalizacja warunków reakcji PCR, zaprojektowanie innych starterów czy zastosowanie bardziej swoistej metody izolacji komórek.

Antygeny swoiste dla nowotworów

Istnieją wysoce charakterystyczne dla nowotworów antygeny nieulegające ekspresji w tkankach prawidłowych (z wyjątkiem jąder i łożyska), będące peptydami prezentowanymi przez cząsteczki MHC klasy I oraz rozpoznawane przez autologiczne cytotoksyczne limfocyty T. Należą tu m.in. 3 rodziny genów *MAGE*, *GAGE* i *BAGE*, których przedstawiciele mogą się pojawić w komórkach HCC [59]. Przynajmniej jeden z tych antygenów ulega ekspresji w 81% przypadków. Spośród nich najczęściej wykrywane są *MAGE-1* oraz *MAGE-3*. *MAGE-1* (melanoma associated antigen gene 1) występuje znacznie częściej w komórkach HCC niż w innych typach nowotworów [60, 61]. Jego mRNA jest wykrywalny z użyciem RT-PCR preferencyjnie w przypadku małych i dobrze zróżnicowanych histologicznie guzów (odpowiednio: 81 i 70%) [62, 59], natomiast brak go w tkance bez guzów nowotworowych.

Na podstawie amplifikacji mRNA swoistego dla *MAGE-1* i *MAGE-3* można również z dużą dokładnością zidentyfikować krążące we krwi komórki HCC, co potwierdzają wyniki oznaczeń statusu genów *MAGE* w okresie okołooperacyjnym [63].

Jednakże z badań tych wynika że CTC pierwotnego raka wątroby mogą być wykryte w późniejszym stadium choroby, gdyż metoda ta pozwala zidentyfikować 10^2 – 10^3 komórek nowotworowych na 106 innych jądrzastych komórek krwi obwodowej. Natomiast posłużenie się nested RT-PCR pozwala wykryć co najmniej jeden z transkryptów u 63% pacjentów z HCC [64]. Co więcej, status pacjenta względem *MAGE-1/3* koreluje ze stopniem rozwoju raka i pozwala zdiagnozować potencjalne mikroprzerzuty u 56% chorych już w II stopniu zaawansowania nowotworu. Problemem pozostaje jednak niewystarczająca czułość oznaczeń markerów oraz obecność powyższych antygenów w innych typach nowotworów.

Odwrotna transkryptaza ludzkiej telomerazy (hTERT)

Telomeraza jest rybonukleoproteidem utrzymującym długość telomerów, będących tandemowymi powtórzeniami 5'TTAGGG'3 (sekwencja ludzka) na końcach eukariotycznych chromosomów i odpowiadających za integral-

ność DNA, zapobiegających ich degradacji, fuzji czy reanżacji [65]. Podczas gdy większość normalnych ludzkich komórek somatycznych nie wykazuje aktywności telomerazy, w szybko proliferujących komórkach linii płciowej, trofoblaście, komórkach hematopoetycznych i w 85–95% komórek nowotworowych gen telomerazy ulega ekspresji [66,67]. Kompleks telomerazy składa się z dwóch podjednostek: komponentu RNA, będącego matrycą dla polimerazy (hTER) [68] oraz właściwej katalitycznej podjednostki o aktywności odwrotnej transkryptazy (human telomerase reversed transcriptase – hTERT) [69].

Skracanie telomerów pełni dwojaką funkcję w rozwoju HCC: z jednej strony indukuje niestabilność chromosomów, przyczyniając się do rozwoju nowotworu, z drugiej strony – progresja raka jest uzależniona od stabilizacji telomerów, co wiąże się z aktywacją telomerazy [70]. Badania kliniczne wskazują na wysoką ekspresję *hTERT* mRNA w komórkach HCC, co koreluje z aktywnością enzymatyczną telomerazy oznaczaną za pomocą metody TRAP (telomere repeat amplification protocol) [71]. Natomiast w tkankach niezmiennych nowotworowo mRNA dla *hTERT* jest nieobecny poza nielicznymi przypadkami marskości. Wiąże się to najpewniej z procesem regeneracji uszkodzonej wątroby, któremu może towarzyszyć pojawianie się ognisk dysplazji hepatocytów, które są stanem przednowotworowym. Ponadto nie można wykluczyć obecności mikroognisk HCC w marskiej wątrobie.

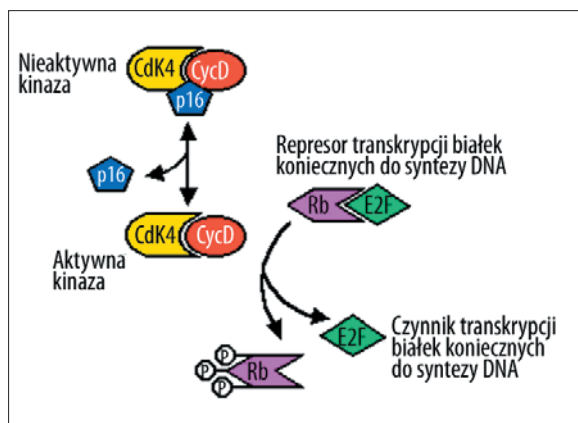
Wu wykazał obecność *hTERT* mRNA we krwi obwodowej u 83% chorych z pierwotnym rakiem wątroby, jednak odnotował występowanie tego zjawiska również u części pacjentów z innymi dolegliwościami wątroby, a nawet u zdrowych ludzi [72]. Przyczyną tego zjawiska może być ekspresja telomerazy np. w leukocytach. Zastosowanie bardzo dokładnej izolacji komórek opartej na negatywnej i pozytywnej selekcji immunomagnetycznej pozwala wykluczyć fałszywie dodatnie wyniki związane z obecnością leukocytów [73]. Analityczna czułość metody wynosi 1–10 komórek HeLa w 2 ml krwi. Jednocześnie wykrywalność CTC w stadium rozsiewu guza wynosiła 85–89%, oraz tylko u 25% pacjentów we wczesnym etapie rozwoju choroby (stadium T1 w skali TNM).

Swobodnie krążące kwasy nukleinowe

Alternatywnym podejściem jest analiza swobodnie krążących kwasów nukleinowych (circulating nucleic acids in plasma or serum – CNAPS) i zmian genetycznych z nimi związanych. Wykazano obecność zwiększonej ilości DNA w osoczu osób cierpiących na różne postacie raka oraz choroby autoimmunologiczne (np. reumatoidalne zapalenie stawów czy toczeń rumieniowaty) [74,75]. Zauważono, że skuteczna terapia choroby powoduje obniżenie poziomu DNA w surowicy. Przyczyną występowania CNAPS może być apoptoza bądź nekroza komórek [76], lub aktywne ich wydzielanie przez komórki nowotworowe. Podobny mechanizm został opisany dla aktywowanych limfocytów [77].

Metylacja promotorów

Przykładem tego typu markera może być białko **p16** (zwane też $p16^{INK4}$). Pełni ono funkcję inhibitora kinazy zależnej od cyklin podobnie jak pokrewne mu białko p15.



Ryc. 2. Rola białka p16 w punkcie kontrolnym restrikcyjnym cyklu komórkowego. Uwolnienie przez p16 kompleksu kinazy i cykliny powoduje fosforylację białka Rb, co z kolei uaktywnia czynnik transkrypcyjny E2F. Na podstawie [83] (zmodyfikowano)

W postaci aktywnej jest zatem „supresorem” komórek nowotworowych, często hipermetylowanym w wielu rodzajach raka [78]. Oba te białka modulują fosforylację białka Rb, wpływając w ten sposób na proliferację komórki (ryc. 2). Stosując metylosoistną reakcję PCR (methylation specific PCR – MSP) [79] można wykryć metylację promotorów genów *P16* i *P15* powodującą wyciszenie ich ekspresji zarówno w tkance guza jak i w surowicy krwi. U prawie 73% pacjentów z metylacją *P16* w obrębie guza podobne zmiany wykryto w próbkach krwi, nie uzyskując jednocześnie fałszywie pozytywnych wyników [80]. Czulość wykrycia metylacji *P15* jest znacznie mniejsza (10^4 versus 10^5 dla *P16*), jednak u 92% pacjentów wykazujących metylację w obu genach w obrębie guza uzyskano wynik pozytywny dla przynajmniej jednego markera w surowicy. Istnieje również możliwość ilościowej analizy MSP (real-time quantitative methylation specific PCR – RTQ-MSP) [81], w której wyniki odzwierciedlają względne ilości zmetylowanych sekwencji w czasie okołoperacyjnym podobne do statusu *AFP* mRNA. Nie uzyskano w tych badaniach żadnych fałszywie pozytywnych wyników, a metodę tę wykorzystał z powodzeniem również Yu do oceny ryzyka rozprzestrzenienia się nowotworu w wyniku biopsji guza [82].

Mutacje mitochondrialne

Somatyczne mutacje w genomie mitochondrialnym zidentyfikowano w kilku postaciach raka, przy czym większość z nich w niekodującym regionie tzw. pętli D [84]. Rejonem hiperzmiennym w tej pętli jest fragment między 303. a 315. nukleotydem zawierający polimorficzne jednonukleotydowe powtórzenia cytozyny. W przypadku komórek HCC wykazano częste pojawianie się mutacji w mtDNA, które są obecne również w tkance otaczającej guz [85] oraz w DNA obecnym w osoczu u 33% pacjentów [86]. Mutacje te są jednak heterogenne i zostały zidentyfikowane przez bezpośrednie sekwencjonowanie fragmentu pętli D, a ich obecność we krwi testem ligacji niesparowa-

nych zasad [87]. Zatem brak jest na razie prostej i uniwersalnej metody oznaczania tych zmian.

Wolny mRNA

Pomimo mniejszej trwałości niż DNA wykazano obecność RNA w postaci związanej z innymi molekułami w surowicy czy osoczu pacjentów z chorobami nowotworowymi. Jedynym jak dotąd zbadanym tego typu markerem w HCC jest *hTERT* mRNA, którego ilości mierzone za pomocą real-time RT-PCR w stosunku do ilości *GAPDH* mRNA wzrastają wraz z postępem choroby [88]. Czulość metody wynosi 89,7%, a zastosowana gruntowna procedura pozbycia się komórek, głównie leukocytów, dodatkowo zapobiega generowaniu fałszywie dodatnich wyników. Jednak obiektywna ocena ilościowa może być utrudniona przez to, że jak wykazali Ng i wsp. poziom mRNA dehydrogenazy 3-fosfogliceraledehydu (*GAPDH*) może być podwyższony we krwi osób z HCC [89].

ZAKOŃCZENIE

Mimo stosunkowo dobrze poznanej patogenezy raka wątrobowokomórkowego skuteczność terapii jest wciąż mała. Rozwój narzędzi diagnostycznych służących do monitorowania i badania krążących komórek nowotworowych jest niezbędny do opracowania nowych protokołów terapeutycznych w celu zminimalizowania rozprzestrzeniania się i wzrostu liczby CTC.

Chociaż żaden ze znanych markerów nie spełnia idealnie warunków swoistości i czulości, to spośród pojedynczych markerów komórek wątroby na szczególną uwagę zasługują enzymy wątrobowe, takie jak GGPT, której swoistość opiera się na wykorzystaniu polimorfizmu sekwencji mRNA, co nie jest możliwe do wykrycia inną metodą niż RT-PCR. Szansą na uzyskanie zadowalającego poziomu wykrywalności, a także ulepszenia dyskryminacji między nowotworowymi i łagodnymi postaciami choroby może być połączenie oznaczeń kilku markerów jednocześnie. W przypadku reakcji PCR rozwiązanie to jest fizycznie wykonalne przez zastosowanie tzw. multiplex PCR, czyli reakcji PCR z użyciem kilku par starterów swoistych dla różnych genów, prowadzonej w jednej próbówce. Można np. wykorzystać marker będący silną determinantą obecności komórek nowotworowych (*MAGE*) w połączeniu z markerem charakterystycznym dla tkanki wątrobowej (*AFP*) [63]. Uznanie za wynik pozytywny obecności co najmniej jednego markera spośród kilku oznaczanych zwiększa poziom wykrywalności mikroprzerzutów w porównaniu z oceną pojedynczych markerów [80,64].

Na uwagę zasługuje też analiza swobodnie krążących kwasów nukleinowych oraz metody oznaczeń ilościowych (real-time RT-PCR) pozwalających bardziej precyzyjnie ocenić ryzyko rozwoju pierwotnego raka wątroby, a także wtórnych guzów. Konieczne są dalsze badania w większych grupach pacjentów z wykorzystaniem ujednoczonych protokołów, zwłaszcza dotyczących izolacji komórek z krwi obwodowej, która pozwala zniwelować tło, źródłem którego są krwinki białe.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abelev G.I., Eraise T.L.: Cellular aspects of alpha-fetoprotein re-expression in tumors. *Semin. Cancer Biol.*, 1999; 9: 95–107
- [2] Aselmann H., Wolfes H., Rohde F., Frerker M., Deiwick A., Jager M.D., Klempnauer J., Schlitt H.J.: Quantification of alpha 1-fetoprotein mRNA in peripheral blood and bone marrow: a tool for perioperative evaluation of patients with hepatocellular carcinoma. *Langenbecks Arch. Surg.*, 2001; 386: 118–123
- [3] Chelly J., Concordet J.P., Kaplan J.C., Kahn A.: Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989; 86: 2617–2621
- [4] Chen C.J., Yu M.W., Liaw Y.F.: Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 1997; 12: S294–S308
- [5] Cheresch D.A., Pierschbacher M.D., Herzig M.A., Mujoo K.: Disialogangliosides G.D.2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins. *J. Cell. Biol.*, 1986; 102: 688–696
- [6] Chou H.C., Sheu J.C., Huang G.T., Wang J.T., Chen D.S.: Albumin messenger RNA is not specific for circulating hepatoma cells. *Gastroenterology*, 1994; 107: 630–631
- [7] Cillo U., Navaglia F., Vitale A., Molari A., Basso D., Bassanello M., Brolese A., Zanus G., Montin U., D'Amico F., Ciarleglio F.A., Carraro A., Bridda A., Burra P., Carraro P., Plebani M., D'Amico D.F.: Clinical significance of alpha-fetoprotein mRNA in blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Clin. Chim. Acta*, 2004; 347: 129–138
- [8] Dong Z.Z., Yao D.F., Yao D.B., Wu X.H., Wu W., Qiu L.W., Jiang D.R., Zhu J.H., Meng X.Y.: Expression and alteration of insulin-like growth factor II-messenger RNA in hepatoma tissues and peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.*, 2005; 11: 4655–4660
- [9] Eraise T.L., Yazova A.K., Poltoranina V.S., Kuprina N.I., Karamova E.R., Shipova L.Y., Lazarevich N.L., Abelev G.I.: Inducible protein in rat hepatomas with expression alternative to alpha-fetoprotein. *Int. J. Cancer*, 1998; 75: 371–378
- [10] Feng J., Funk W.D., Wang S.S., Weinrich S.L., Avilion A.A., Chiu C.P., Adams R.R., Chang E., Allsopp R.C., Yu J.: The RNA component of human telomerase. *Science*, 1995; 269: 1236–1241
- [11] Filmus J.: Glycans in growth control and cancer. *Glycobiology*, 2001; 11: 19R–23R
- [12] Filmus J., Shi W., Wong Z.M., Wong M.J.: Identification of a new membrane-bound heparan sulphate proteoglycan. *Biochem. J.*, 1995; 311: 561–565
- [13] Fliss M.S., Usadel H., Caballero O.L., Wu L., Buta M.R., Eleff S.M., Jen J., Sidransky D.: Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science*, 2000; 287: 2017–2019
- [14] Funaki N.O., Tanaka J., Imamura M.: Quantitative analysis of alpha-fetoprotein mRNA in circulating peripheral blood of patients with hepatocellular and alpha-fetoprotein-producing gastric carcinomas. *Life Sci.*, 1998; 62: 1973–1984
- [15] Funaki N.O., Tanaka J., Seto S., Kasamatsu T., Kaido T., Imamura M.: Highly-sensitive identification of alpha-fetoprotein mRNA in circulating peripheral blood of hepatocellular carcinoma patients. *Life Sci.*, 1995; 57: 1621–1631
- [16] Funaki N.O., Tanaka J., Seto S.I., Kasamatsu T., Kaido T., Imamura M.: Hematogenous spreading of hepatocellular carcinoma cells: possible participation in recurrence in the liver. *Hepatology*, 1997; 25: 564–568
- [17] Ghossein R.A., Bhattacharya S., Rosai J.: Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors. *Clin. Cancer Res.*, 1999; 5: 1950–1960
- [18] Greider C.W.: Telomere length regulation. *Annu. Rev. Biochem.*, 1996; 65: 337–365
- [19] Han G.Q., Qin C.Y., Shu R.H.: The analysis of gamma-glutamyl transpeptidase gene in different type liver tissues. *World J. Gastroenterol.*, 2003; 9: 276–280
- [20] Herman J.G., Graff J.R., Myohanen S., Nelkin B.D., Baylin S.B.: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 9821–9826
- [21] Holthuisen P., van der Lee F.M., Ikejiri K., Yamamoto M., Sussenbach J.S.: Identification and initial characterization of a fourth leader exon and promoter of the human IGF-II gene. *Biochim. Biophys. Acta*, 1990; 1087: 341–343
- [22] Inoue H., Mori M., Honda M., Li J., Shibuta K., Mimori K., Ueo H., Akiyoshi T.: The expression of tumor-rejection antigen "MAGE" genes in human gastric carcinoma. *Gastroenterology*, 1995; 109: 1522–1525
- [23] Ishak K.G., Glunz P.R.: Hepatoblastoma and hepatocarcinoma in infancy and childhood. Report of 47 cases. *Cancer*, 1967; 20: 396–422
- [24] Jeng K.S., Sheen I.S., Tsai Y.C.: Does the presence of circulating hepatocellular carcinoma cells indicate a risk of recurrence after resection? *Am. J. Gastroenterol.*, 2004; 99: 1503–1509
- [25] Kar S., Carr B.I.: Detection of liver cells in peripheral blood of patients with advanced-stage hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 1995; 21: 403–407
- [26] Kim J.W., Ye Q., Forgues M., Chen Y., Chen Y., Budhu A., Sime J., Hofseth L.J., Kaul R., Wang X.W.: Cancer-associated molecular signature in the tissue samples of patients with cirrhosis. *Hepatology*, 2004; 39: 518–527
- [27] Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W.: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994; 266: 2011–2015
- [28] Kobayashi Y., Higashi T., Nouse K., Nakatsukasa H., Ishizaki M., Kaneyoshi T., Toshikuni N., Kariyama K., Nakayama E., Tsuji T.: 2000. Expression of MAGE, GAGE and BAGE genes in human liver diseases: utility as molecular markers for hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, 2000; 32: 612–617
- [29] Komeda T., Fukuda Y., Sando T., Kita R., Furukawa M., Nishida N., Amenomori M., Nakao K.: Sensitive detection of circulating hepatocellular carcinoma cells in peripheral venous blood. *Cancer*, 1995; 75: 2214–2219
- [30] Lage H., Dietel M.: Cloning and characterization of human cDNAs encoding a protein with high homology to rat intestinal development protein OCI-5. *Gene*, 1997; 188: 151–156
- [31] Lee C.M., Hsu C.Y., Eng H.L., Huang W.S., Lu S.N., Changchien C.S., Chen C.L., Cho C.L.: Telomerase activity and telomerase catalytic subunit in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 2004; 51: 796–800
- [32] Lemoine A., Le Bricon T., Salvucci M., Azoulay D., Pham P., Raccuia J., Bismuth H., Debuire B.: Prospective evaluation of circulating hepatocytes by alpha-fetoprotein mRNA in humans during liver surgery. *Ann. Surg.*, 1997; 226: 43–50
- [33] Leon S.A., Ehrlich G.E., Shapiro B., Labbate V.A.: Free D.N.A in the serum of rheumatoid arthritis patients. *J. Rheumatol.*, 1977; 4: 139–143
- [34] Li D., Mallory T., Satomura S.: AFP-L3: a new generation of tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Clin. Chim. Acta*, 2001; 313: 15–19
- [35] Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipursky L., Darnell J.: *Cancer, 23.4 Mutations Causing Loss of Growth-Inhibiting and Cell-Cycle Controls W: Molecular cell biology*, 5th ed., New York: W. H. Freeman and Company 2004
- [36] Louha M., Nicolet J., Zylberberg H., Sabile A., Vons C., Vona G., Poussin K., Tournebise M., Capron F., Pol S., Franco D., Lacour B., Brechot C., Paterlini-Bréchet P.: Liver resection and needle liver biopsy cause hematogenous dissemination of liver cells. *Hepatology*, 1999; 29: 879–882
- [37] Matsumura M., Ijichi M., Shiratori Y., Togo G., Hikiba Y., Inoué K., Kohara M., Omata M.: Simple quantitative assay of alpha-fetoprotein mRNA in liver tissue using the real-time detection polymerase chain reaction assay – its application for clinical use. *Hepatol. Res.*, 2001; 20: 84–96
- [38] Matsumura M., Niwa Y., Hikiba Y., Okano K., Kato N., Shiina S., Shiratori Y., Omata M.: Sensitive assay for detection of hepatocellular carcinoma associated gene transcription (alpha-fetoprotein mRNA) in blood. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995; 207: 813–818
- [39] Matsumura M., Niwa Y., Kato N., Komatsu Y., Shiina S., Kawabe T., Kawase T., Toyoshima H., Ihori M., Shiratori Y. et al.: Detection of alpha-fetoprotein mRNA, an indicator of hematogenous spreading hepatocellular carcinoma, in the circulation: a possible predictor of metastatic hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 1994; 20: 1418–1425
- [40] Meyerson M., Counter C.M., Eaton E.N., Ellisen L.W., Steiner P., Caddle S.D., Ziaugra L., Beijersbergen R.L., Davidoff M.J., Liu Q., Bacchetti S., Haber D.A., Weinberg R.A.: hE5T2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*, 1997; 90: 785–795

- [41] Miura N., Maeda Y., Kanbe T., Yazama H., Takeda Y., Sato R., Tsukamoto T., Sato E., Marumoto A., Harada T., Sano A., Kishimoto Y., Hirooka Y., Murawaki Y., Hasegawa J., Shiota G.: Serum human telomerase reverse transcriptase messenger RNA as a novel tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 3205–3209
- [42] Miyamoto A., Fujiwara Y., Sakon M., Nagano H., Sugita Y., Kondo M., Eguchi H., Dono K., Umeshita K., Nakamori S., Monden M.: Development of a multiple-marker RT-PCR assay for detection of micrometastases of hepatocellular carcinoma. *Dig. Dis. Sci.*, 2000; 45: 1376–1382
- [43] Morimoto O., Nagano H., Miyamoto A., Fujiwara Y., Kondo M., Yamamoto T., Ota H., Nakamura M., Wada H., Damdinsuren B., Marubashi S., Dono K., Umeshita K., Nakamori S., Sakon M., Monden M.: Association between recurrence of hepatocellular carcinoma and alpha-fetoprotein messenger RNA levels in peripheral blood. *Surg. Today*, 2005; 35: 1033–1041
- [44] Mou D.C., Cai S.L., Peng J.R., Wang Y., Chen H.S., Pang X.W., Leng X.S., Chen W.F.: Evaluation of MAGE-1 and MAGE-3 as tumor-specific markers to detect blood dissemination of hepatocellular carcinoma cells. *Br. J. Cancer*, 2002; 86: 110–116
- [45] Müller C., Petermann D., Pfeffel F., Oesterreicher C., Fugger R.: Lack of specificity of albumin-mRNA-positive cells as a marker of circulating hepatoma cells. *Hepatology*, 1997; 25: 896–899
- [46] Nagata Y., Yamashiro S., Yodoi J., Lloyd K.O., Shiku H., Furukawa K.: Expression cloning of beta 1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase cDNAs that determine the expression of GM2 and GD2 gangliosides. *J. Biol. Chem.*, 1994; 267: 12082–12809
- [47] Nakatsura T., Kageshita T., Ito S., Wakamatsu K., Monji M., Ikuta Y., Senju S., Ono T., Nishimura Y.: Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clin. Cancer Res.*, 2004; 10: 6612–6621
- [48] Nakatsura T., Yoshitake Y., Senju S., Monji M., Komori H., Motomura Y., Hosaka S., Beppu T., Ishiko T., Kamohara H., Ashihara H., Katagiri T., Furukawa Y., Fujiyama S., Ogawa M., Nakamura Y., Nishimura Y.: Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 306: 16–25
- [49] Ng E.K., Tsui N.B., Lam N.Y., Chiu R.W., Yu S.C., Wong S.C., Lo E.S., Rainer T.H., Johnson P.J., Lo Y.M.: Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clin. Chem.*, 2002; 48: 1212–1217
- [50] Nishikawa M., Nishiguchi S., Shiomi S., Tamori A., Koh N., Takeda T., Kubo S., Hirohashi K., Kinoshita H., Sato E., Inoue M.: Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in individuals with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.*, 2001; 61: 1843–1845
- [51] Nishio H., Dugaiczky A.: Complete structure of the human alpha-albumin gene, a new member of the serum albumin multigene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 7557–7561
- [52] Nobori T., Miura K., Wu D.J., Lois A., Takabayashi K., Carson D.A.: Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*, 1994; 368: 753–756
- [53] Nomoto S., Yamashita K., Koshikawa K., Nakao A., Sidransky D.: Mitochondrial D-loop mutations as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma and plasma. *Clin. Cancer Res.*, 2002; 8: 481–487
- [54] Ogden S.K., Lee K.C., Barton M.C.: Hepatitis B viral transactivator HBx alleviates p53-mediated repression of alpha-fetoprotein gene expression. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 27806–27814
- [55] Okochi O., Hibi K., Uemura T., Inoue S., Takeda S., Kaneko T., Nakao A.: Detection of mitochondrial DNA alterations in the serum of hepatocellular carcinoma patients. *Clin. Cancer Res.*, 2002; 8: 2875–2878
- [56] Okuda N., Nakao A., Takeda S., Oshima K., Kanazumi N., Nonami T., Kurokawa T., Takagi H.: Clinical significance of alpha-fetoprotein mRNA during perioperative period in HCC. *Hepatogastroenterology*, 1999; 46: 381–338
- [57] Paterlini-Bréchet P., Vona G., Bréchet C.: Circulating tumorous cells in patients with hepatocellular carcinoma. Clinical impact and future directions. *Semin. Cancer Biol.*, 2000; 10: 241–249
- [58] Pawlak A., Cohen E.H., Octave J.N., Schweickhardt R., Wu S.J., Bulle F., Chikhi N., Baik J.H., Siegrist S., Guellaen G.: An alternatively processed mRNA specific for gamma-glutamyl transpeptidase in human tissues. *J. Biol. Chem.*, 1990; 265: 3256–3262
- [59] Rogers J.C., Boldt D., Kornfeld S., Skinner A., Valeri C.R.: Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin or antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1972; 69: 1685–1699
- [60] Sawabu N., Nakagen M., Ozaki K., Wakabayashi T., Toya D., Hattori N., Ishii M.: Clinical evaluation of specific gamma-GTP isoenzyme in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 1983; 51: 327–331
- [61] Schirmacher P., Held W.A., Yang D., Chisari F.V., Rustum Y., Rogler C.E.: Reactivation of insulin-like growth factor II during hepatocarcinogenesis in transgenic mice suggests a role in malignant growth. *Cancer Res.*, 1992; 52: 2549–2556
- [62] Shay J.W., Bacchetti S.: A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer*, 1997; 33: 787–791
- [63] Sheen I.S., Jeng K.S., Tsai Y.C.: Is the expression of gamma-glutamyl transpeptidase messenger RNA an indicator of biological behavior in recurrent hepatocellular carcinoma? *World J. Gastroenterol.*, 2003; 9: 468–473
- [64] Shimojima M., Komine F., Hisatomi H., Shimizu T., Moriyama M., Arakawa Y.: Detection of telomerase activity, telomerase RNA component, and telomerase reverse transcriptase in human hepatocellular carcinoma. *Hepatol. Res.*, 2004; 29: 31–38
- [65] Sohda T., Yun K., Iwata K., Soejima H., Okumura M.: Increased expression of insulin-like growth factor 2 in hepatocellular carcinoma is primarily regulated at the transcriptional level. *Lab. Invest.*, 1996; 75: 307–311
- [66] Stroun M., Lyautey J., Lederrey C., Olson-Sand A., Anker P.: About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin. Chim. Acta*, 2001; 313: 139–142
- [67] Sugita Y., Fujiwara Y., Hoon D.S., Miyamoto A., Sakon M., Kuo C.T., Monden M.: Overexpression of beta 1,4N-acetylgalactosaminyltransferase mRNA as a molecular marker for various types of cancers. *Oncology*, 2002; 62: 149–156
- [68] Sung Y.K., Hwang S.Y., Park M.K., Farooq M., Han I.S., Bae H.I., Kim J.C., Kim M.: Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.*, 2003; 94: 259–262
- [69] Tan E.M., Schur P.H., Carr R.L., Kunkel H.R.: Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.*, 1966; 45: 1732–1740
- [70] Tomasi T.B. Jr. Structure and function of alpha-fetoprotein. *Ann. Rev. Med.*, 1977; 28: 453–465
- [71] Toretsky J.A., Zitomersky N.L., Eskenazi A.E., Voigt R.W., Strauch ED., Sun C.C., Huber R., Meltzer S.J., Schlessinger D.: Glypican-3 expression in Wilms tumor and hepatoblastoma. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 2001; 23: 496–499
- [72] Tsuchida T., Ravindranath M.H., Saxton R.E., Irie R.F.: Gangliosides of human melanoma: altered expression *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Res.*, 1987; 47: 1278–1281
- [73] Tsutsumi M., Sakamuro D., Takada A., Zang S.C., Furukawa T., Taniguchi N.: Detection of a unique gamma-glutamyl transpeptidase messenger RNA species closely related to the development of hepatocellular carcinoma in humans: a new candidate for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 1996; 23: 1093–1097
- [74] Uchida K., Kondo M., Takeda S., Osada H., Takahashi T., Nakao A., Takahashi T.: Altered transcriptional regulation of the insulin-like growth factor 2 gene in human hepatocellular carcinoma. *Mol. Carcinog.*, 1997; 18: 193–198
- [75] Waguri N., Suda T., Nomoto M., Kawai H., Mita Y., Kuroiwa T., Igarashi M., Kobayashi M., Fukuhara Y., Aoyagi Y.: Sensitive and specific detection of circulating cancer cells in patients with hepatocellular carcinoma; detection of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA after immunomagnetic separation. *Clin. Cancer Res.*, 2003; 9: 3004–3011
- [76] Weynants P., Lethe B., Brasseur F., Marchand M., Boon T.: Expression of mage genes by non-small-cell lung carcinomas. *Int. J. Cancer*, 1994; 56: 826–829
- [77] Witzigmann H., Geissler F., Benedix F., Thiery J., Uhlmann D., Tannapfel A., Wittekind C., Hauss J.: Prospective evaluation of circulating hepatocytes by alpha-fetoprotein messenger RNA in patients with hepatocellular carcinoma. *Surgery*, 2002; 131: 34–43
- [78] Wojciechowska U., Didkowska J., Tarkowski W., Zatoński W.: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2003 roku. Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie. Warszawa 2005
- [79] Wong I.H., Lau W.Y., Leung T., Johnson P.J.: Quantitative comparison of alpha-fetoprotein and albumin mRNA levels in hepatocellular carcinoma/adenoma, non-tumor liver and blood: implications in cancer detection and monitoring. *Cancer Lett.*, 2000; 156: 141–149
- [80] Wong I.H., Leung T., Ho S., Lau W.Y., Chan M., Johnson P.J.: Semiquantification of circulating hepatocellular carcinoma cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Br. J. Cancer.*, 1997; 76: 628–633

- [81] Wong I.H., Lo Y.M., Zhang J., Liew C.T., Ng M.H., Wong N., Lai P.B., Lau W.Y., Hjelm N.M., Johnson P.J.: Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res.*, 1999; 59: 71–73
- [82] Wong I.H., Zhang J., Lai P.B., Lau W.Y., Lo Y.M.: Quantitative analysis of tumor-derived methylated p16INK4a sequences in plasma, serum, and blood cells of hepatocellular carcinoma patients. *Clin. Cancer Res.*, 2003; 9:1047–1052
- [83] Wu W., Yao D.F., Qiu L.W., Wu X.H., Yao M., Su X.Q., Zou L.: Abnormal expression of hepatomas and circulating telomerase and its clinical values. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, 2005; 4: 544–549
- [84] Yamashita N., Ishibashi H., Hayashida K., Kudo J., Takenaka K., Itoh K., Niho Y.: High frequency of the MAGE-1 gene expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 1996; 24: 1437–1440
- [85] Yao F., Guo J.M., Xu C.F., Lou Y.L., Xiao B.X., Zhou W.H., Chen J., Hu Y.R., Liu Z., Hong G.F.: Detecting AFP mRNA in peripheral blood of the patients with hepatocellular carcinoma, liver cirrhosis and hepatitis. *Clin. Chim. Acta*, 2005; 361: 119–127
- [86] Yu S.C., Lo D.Y., Ip C.B., Liew C.T., Leung T.W., Lau W.Y.: Does percutaneous liver biopsy of hepatocellular carcinoma cause hematogenous dissemination? An *in vivo* study with quantitative assay of circulating tumor DNA using methylation-specific real-time polymerase chain reaction. *Am. J. Roentgenol.*, 2004; 183: 383–385
- [87] Zhou L., Liu J., Luo F.: Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.*, 2006; 12: 1175–1181
- [88] Zhou X.P., Wang H.Y., Yang G.S., Chen Z.J., Li B.A., Wu M.C.: Cloning and expression of MXR7 gene in human HCC tissue. *World J. Gastroenterol.*, 2000; 6: 57–60
- [89] Zhu Z.W., Friess H., Wang L., Abou-Shady M., Zimmermann A., Lander A.D., Kore M., Kleeff J., Buchler M.W.: Enhanced glypican-3 expression differentiates the majority of hepatocellular carcinomas from benign hepatic disorders. *Gut*, 2001; 48: 558–564