

## ЗНАЧАЈ ОДРЕЂИВАЊА АФР И СЕА КОД ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО ИНДУКОВАНОГ ГЛИОМА

Ристић-Витаљих С., Смилић Љ., Живић Ж.

Интерна клиника, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

## IMPORTANCE OF AFP AND CEA DETERMINATION IN EXPERIMENTALY INDUCED GLIOMA

Ристић-Витаљих С., Смилић Љ., Живић Ж.

Internal clinic, Medical faculty Priština, Kosovska Mitrovica

### SUMMARY

Beside great improvement in diagnostic and therapeutic approach in curement of brain tumors, gliomas still have bad prognosis. Better results could be obtained only in early tumor discovery. Alpha pheto protein (AFP) and carcinoembryonic antigen (CEA) are markers specific for certain carcinomas (hepatocellular, nonseminated testicular, colorectal). Their specificity for gliomas still has not been stated. The aim of this study was to determine tissue or sera levels of AFP, and CEA in experimentally induced gliomas, and their potential use in human gliomas diagnosis. For analyses, tissue supernatant homogenate C6 of rat glioma and sera were used during different phases of development (days 0,7,14,21 and 31). Tumor markers were also determined as well as in tissue of human brain tumors (two anaplastic astrocytomas and one glioblastoma). Technique applied was immunoenzyme type Mein method. Obtained results showed no signs of AFP either in sera, or in rat brain tissue or human glioma tissue. CEA however, showed statistically, important specificity, for glioma tissue. During tumorigenesis tissue concentration of CEA showed statistically higher levels in comparison with controls, starting from day 7, reaching peak of tumorigenesis on day 21, ( $p < 0.001$ ). CEA was not detectable in control animal group sera, and also during the period of tumor development. CEA concentration obtained from animal brain were similar to those in human brain tissue tumors. Further investigation need to be carried out, in order to determine the potential role of this marker in diagnosis and treatment establishment course.

**Key words:** Alpha pheto protein (AFP), Carcinoembryonic antigen (CEA), C6 of rat glioma.

### САЖЕТАК

И поред великог напретка у дијагнози и хирушкој терапији тумори мозга и посебно глиоми и даље имају лошу прогнозу. Напредак у терапији глиома може бити постигнут уколико се они дијагностификују што раније. Алфа-фето протеин (АФР) и карциноембрионални антиген (СЕА) су маркери који су специфични за извесне карциноме (хепатоцелуларни, несеминовани тестикуларни, колоректални). Њихова специфичност за глиоме још увек није утврђена. Зато је циљ овог рада био да се одреде ткивни/или серумски нивои АФР, СЕА у експерименталним глиомима, као и да се одреди њихова потенцијална примена у дијагнози хуманих глиома. За анализе су коришћени супернатант ткивног хомогената С6 пацовског глиома у различитим фазама развоја (дани 0,7,14,21 и 31) и серум. Туморски маркери су одређивани и у ткиву хуманих можданих тумора (два анапластична астроцитоме и један глиобластом). Коришћена је имуноензимска тзв. Меја метода. Добијени резултати су показали да АФР није био присутан ни у серуму ни у мозгу пацова, као ни у ткиву хуманих глиома. Међутим, СЕА је показао значајну специфичност за глиомска ткива. У току туморогенезе ткивна концентрација СЕА је статистички значајно порасла у односу на контроле, већ од седмог дана и достигла тзв. пик туморогенезе 21. дана ( $p < 0,001$ ). СЕА није био присутан у серуму контролне групе животиња као ни у току развоја тумора. Концентрација СЕА добијена у мозгу животиња је била слична концентрацијама добијеним у ткиву хуманих можданих тумора. Потребна су даља испитивања да би се одредила потенцијална примена овог маркера у дијагнози и лечењу тумора мозга.

**Кључне речи:** Alpha pheto protein (AFP), Carcinoembryonic antigen (CEA), С6 пацовски глиом.

### УВОД

И поред великог напретка у дијагностици и хирушкој терапији тумори мозга а посебно глиоми имају и даље лошу прогнозу и представљају велики социјално-медицински проблем (Андрев и сар., 1995). Процењено је да је у општој популацији смртност од примарног тумора мозга око 2%, и да се тај проценат помера на 7 померањем старосне границе (до 70 г.). Код млађих особа (до 15 год.) од свих дијагностикованих тумора око 20% отпада на малигне туморе мозга (Andrew и сар., 1995).

Како је за лечење малигнух болести од пресудног значаја њихово што раније откривање, у последње време улажу се велики напори од стране научника широм света како би се развиле дијагностичке методе које би омогућиле рану дијагнозу малигнух тумора ради бољег третмана и савлађивања болести. Тзв. "туморски маркери" су резултат таквих напора у последњих 40 година. То су макромолекуле чија појава и промене концентрације, на неки начин, указују на генезу и раст малигнух тумора.

AFP као онкопротеин први пут је идентификован 1964. г. (Татаринов, 1964). Клинички значај овог протеина као туморског маркера је у дијагнози и класификацији *несеминовано̄ шесцићуларно̄ и примарно̄ хејаиоцелуларно̄ карцинома* (Bosl и сар., 1981; Wepsic, 1981). Алфа фето протеин је коришћен и као маркер у цереброспиналној течности (CSP) за рану детекцију можданих тумора (Koskimeimi, 1988). Заједно са СЕА и HCG AFP је мерен и компариран имунохистохемијски код 24 герминома (Numato, 1993), при чему је утврђено да ови маркери нису корисни за рану детекцију тумора. СЕА је први пут описан као туморски антиген 1965. г. (Gold and Freedman, 1965). Ниво овог маркера корелира са хистолошком диференцијацијом пацијената са *коло-ректалним карциномом* (Реуносо и сар., 1972; Wanebo, 1983). Одређивање СЕА у цереброспиналној течности може да детектује малигне менингиоме али не постоји корелација између концентрације СЕА и величине туморске масе (Numato, 1993).

До данас нису познати туморски маркери који би били специфични за мождане туморе. Узимајући ово у обзир, као и податке о коришћењу AFP и СЕА као маркере у цереброспиналној течности, одлучено је да се поменути маркери прате код експерименталног пацовског глиома.

## ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Циљеви овог истраживања били су да се:

- Одреди концентрација туморских маркера AFP и СЕА у серуму и мозгу код животиња са индукованим можданим тумором (анимални модел),
- Прати концентрација ових туморских маркера у току развоја можданог тумора,
- Одреди концентрација AFP и СЕА у хуманом ткиву можданих тумора.

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Једна од најчешће коришћених туморских ћелијских линија *ин витро* у неуробиологији су С6 ћелије (Bullard and Bigner, 1981; Bissell et al., 1974). С6 ћелијска линија представља континуирану ћелијску линију глиома пацова, који је првобитно индукован код Wistar пацова интравенском апликацијом N-metil nitrozouреје (Benda et al. 1969). С обзиром да је она и трансплантацибилна линија, често се користи за индукцију *in vivo* модела примарног можданог тумора. Сматра се да по хистолошким особинама и биолошком понашању овај експериментални тумор одговара хуманом анапластичном астроцитомо градус II/III (Bissell et al., 1974). С6 ћелије су одржаване у култури на хранљивој подлози DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) медијуму, уз додаток 10% v/v инактивисаног фетусног телећег серума (FCS-fetal calf serum) и мешавине антибиотика и антимикотика (пеницилин - 100 U/ml, стрептомицин - 100 µg/ml и amfotericin B - 25 µg/ml). Фласкови са ћелијама су чувани у влажној атмосфери у присуству 5% CO<sub>2</sub> на температури од 37°C. У циљу припреме ћелија за церебралну имплантацију, ћелије су трипсинизирани, цен-

трифугиране, испиране и ресуспендоване у PBS-у (Phosphate Buffered Saline). Церебрална имплантација С6 ћелија урађена је на Wistar пацовима просечне масе 242 г, мушког пола, након урађене краниотомије у десном фронтотаријеталном региону мозга. Код животиња се тумор развијао 21-25. дана. Туморски маркери одређивани су у серуму и мозгу експерименталних животиња. Крв за одређивање туморских маркера узимана је након блага анестезије етром кардијалном пункцијом, након чега је подвргнута уобичајеној процедури за добијање серума, док је ткиво мозга након декапитације обрађено по посебној процедури за добијање супернатанта. Прво је хомогенизовано на 13.500 obr/min. у току 30 sec, а затим центрифугирано на 40.000 obr/min. Ткиво мозга за праћење маркера у току развоја тумора узимано је у пет наврата: првог (24<sup>h</sup> након имплантирања малигнућ ћелија), 7, 14, 21, и 31 дана. Хумани материјал добијен је са Неурохируршке клинике Клиничког центра у Београду, након операције одстрањивања тумора мозга. Туморски маркери одређивани су на аутоанализатору IMX фирме Abbott, коришћењем имуноензимске методе MEIA (Microparticle Enzyme Immuno Assay). Принцип коришћење методе је реакција антитета са антигенима из серума, супернатанта ткива и реакционих ћелија. Настали комплекс антиген-антитело се испира и на крају инкубира са флуорогеним супстратом (4-methylumbellifery Phosphate).

Резултати добијени у овом експерименту су статистички обрађени студентовим Т-тестом методом два везана узорка. Значајност разлике према контролној групи представљена је вредностима:  $p > 0,05$  не постоји статистички значајна разлика и  $p < 0,001$  постоји статистички високо значајна разлика. DMEM хранљиви медијум, FCS, готова микстура антибиотика и антимикотика, солуција за трипсинизацију, све друге стандардне хемикалије за одржавање ћелијских култура, као и пластично посуђе за једнократну употребу, добијени су од фирме ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, SAD. Реагенси (СЕА I AFP), калибратори и контроле добијени су од фирме Abbott.

С6 ћелије глиома пацова добијене су од Проф. Др Стукалова (Институт за молекуларну генетику, Москва, Русија).

Wistar пацови, мушког пола одгајани су у Виваријуму центра за Биомедицинска истраживања ICN Галеника Института.

## РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

С обзиром да AFP и СЕА нису до сада одређивани у серуму и ткиву мозга Wistar пацова требало је урадити контролну групу, и на основу добијених контролних вредности вршити даља мерења у патологији. За контролну групу коришћен је свеж и замрзнут (24<sup>h</sup>) серум, и свеж и замрзнут (24<sup>h</sup>) супернатант ткива мозга нормалних пацова.

Поређење свежих и замрзнутих узорака вршено је да би се утврдиле евентуалне разлике, односно ефекат замрзавања на концентрацију испитиваних туморских маркера.

### 4.3.1. AFP

Контролна група за AFP садржала је 7 свежих узорака серума и 5 замрзнутих, у којима нису добијене мерљиве вредности овог туморског антигена (табела 1). Такође, ни ткиво мозга није садржало овај антиген, а одређивање је урађено на седам свежих узорака мозга и 5 замрзнутих узорака (табела 1).

**Табела 1.** - AFP у серуму и мозгу нормалних њацова.

СЕРУМ		СУПЕРНАТАТ ТКИВА МОЗГА	
Свеж	24 <sup>h</sup> на +4°C	Свеж	Замрзнут
0.00	0.00	0.00	0.13
0.00	0.00	0.00	0.14
0.00	0.00	0.00	0.04
0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.03
0.00		0.00	
0.00		0.00	

Карциноембрионални антиген одређиван је, као и код предходног маркера, у свежем и замрзнутом серуму Wistar пацова. Мерење је урађено на по 5 узорака серума. И у овом случају нису добијене мерљиве вредности маркера (види табелу 2). У свежем супернатанту ткива мозга (на 15 узорака) добијене су средње вредности маркера 5,002 ng/ml. Добијене референтне вредности у оквиру две стандардне девијације су се кретале од 3,16-6,84 ng/ml (табела 2). У замрзнутом ткиву мозга добијене су нешто ниже средње вредности овог маркера (3,94 ng/ml), па су се референтне вредности кретале од 2,36-5,52 ng/ml (види табелу 2).

**Табела 2.** - СЕА у серуму и мозгу нормалних њацова.

СЕРУМ		СУПЕРНАТАТ ТКИВА МОЗГА	
Свеж	24 <sup>h</sup> на +4°C	Свеж	Замрзнут
2.80	0.00	3.54	3.77
0.00	0.00	4.62	3.92
0.00	0.10	5.22	5.14
0.00	0.00	4.82	3.13
0.00	0.00	5.30	4.16
		5.55	
		5.40	
		4.70	
		4.32	
		5.28	
		5.88	
		5.18	
		6.43	
		2.86	
		5.93	
ср. вредн.		5.00	3.94
СД		0.92	0.79
Рефер. вредн.		3.16-6.84	2.36-5.52

Након одређивања туморских маркера у контролној групи, одређена је концентрација туморских

маркера код животиња којима је претходно индукован мождани тумор, уз праћење концентрације маркера у току развоја можданог тумора.

### 4.4.1. AFP

Алфа фето протеин у току туморогенезе је праћен у првом, седмом и 14. дану након имплантације С6 ћелија. Вредности овог маркера нису биле мерљиве ни у једној испитиваној временској тачки ни у серуму ни у ткиву мозга (табела 3).

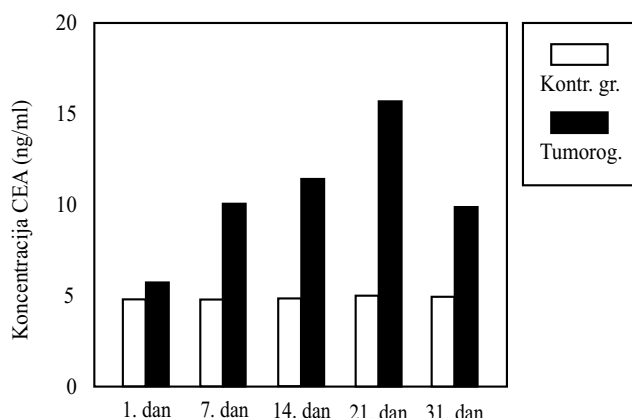
**Табела 3.** - AFP у серуму и мозгу њацова у току туморогенезе.

1. ДАН		7. ДАН		14. ДАН	
Серум	Суперн. мозга	Серум	Суперн. мозга	Серум	Суперн. мозга
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.00		0.00		0.00
	0.00		0.00		0.00
	0.00		0.00		0.00
	0.00		0.00		0.00

СЕА у току развоја тумора мерен је у серуму у првом, 7., и 14. дану туморогенезе. С обзиром да нису добијене мерљиве вредности испитиваних маркера серум је искључен за даља одређивања. У ткиву мозга у првом дану туморогенезе добијена средња вредност (x-5.83 ng/ml) је била приближна средњој вредности контролне групе (x-5,002 ng/ml; табела 4). У седмом дану туморогенезе забележен је пораст концентрације овог маркера (x-10,25 ng/ml). Статистичка обрада добијених вредности између контролне групе и групе седмог дана после имплантације С6 ћелија глиома, показала је да је разлика статистички високо значајна (p<0,001; види графикон 1). Концентрација СЕА у 14. и 21. дану туморогенезе и даље расте Међутим у 31. дану туморогенезе вредност СЕА (10,1 ng/ml) показује пад концентрације овог маркера.

**Табела 4.** - СЕА у серуму и мозгу њацова са експерименталним можданим тумором.

1. ДАН		7. ДАН		14. ДАН		21. ДАН		31. ДАН	
Серум	Суперн. мозга	Серум	Суперн. мозга	Серум	Суперн. мозга	Суперн. мозга	Суперн. мозга	Серум	Суперн. мозга
0.00	3.97	0.00	7.72	0.00	9.20	17.80	8.00		
0.00	6.06	0.00	8.30	0.00	11.20	14.70	12.20		
0.00	7.45	0.00	7.80	0.00	12.00				
			10.40		10.80				
			11.50		13.80				
			9.45		16.00				
			13.80						
			10.50						
			12.80						
ср. вред.	5.83		10.25		12.17	16.23	10.10		
СД	1.75		1.72		2.41	2.16	2.97		



Графикон 1. - Концентрација CEA у току туморогенезе.

У хуманом ткиву мозга са анапластичним астроцитомом концентрације АФР биле су 0,78 и 3,56 ng/ml док у ткиву глиобластома нису добијене мерљиве вредности овог маркера (табела 5). Концентрације карциноембрионалног антигена у ткиву мозга са анапластичним астроцитомом су износиле од 66,9 до 282 ng/ml, а у глиобластома вредност овог антигена била је 53,92 ng/ml.

Табела 5. - CEA у серуму и мозгу пацова са експерименталним можданим тумором.

Тип можданог тумора	AFP	CEA
Анапластични астроцитом	0.78	282.9
Анапластични астроцитом	3.56	66.91
Глиобластом	0.00	53.92

## ДИСКУСИЈА

Подаци добијени из досада урађених студија указују да туморски маркери који су коришћени у овом експерименту нису специфични за малигне мождане туморе. Постоји неколико радова који указују на везу АФР и интракранијалних тумора (Koskimeimi, 1988). Међутим, резултати добијени у овој студији нису показали присуство овог антигена у мозгу пацова чак ни у физиолошким концентрацијама. Познато је да тумор асоцирани антигени нису специфични само за један тумор, већ да се ослобађају из великог броја малигно трансформисаних ћелија. Карциноембрионални антиген присутан је у многим малигним ткивима. Тако је утврђено да цереброспинална течност пацијената са малигним меланомом садржи овај антиген (Numato, 1993). Може се претпоставити да у фази активне деобе туморских ћелија концентрација овог маркера расте и достиже такозвани пик туморогенезе 14. дана после интра-

церебралне имплантације С6 ћелија глиома. По завршетку развоја тумора концентрација овог антигена постепено опада, чиме се на неки начин завршава експримирање овог антигена у глиомским ћелијама. Висока концентрација CEA у хуманим туморима мозга указује да се овај туморски маркер јавља и у ћелијама хуманих глиома. Потребна су даља испитивања да би се одредила потенцијална примена овог маркера у дијагнози и праћењу тумора мозга.

## ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата могу да се изведу следећи закључци:

Ни у серуму ни у ткиву мозга Wistar пацова који су коришћени као контролна група нису добијене мерљиве вредности АФР.

У серуму пацова контролне групе нису добијене мерљиве вредности CEA а у узорцима ткива мозга концентрација овог маркера износила је  $x \pm SD$  3,16-6,84 ng/ml.

У току туморогенезе вредности АФР нису биле мерљиве ни у једној испитиваној тачки (први, седми и 14 дан), ни у серуму ни у ткиву мозга пацова.

У серуму пацова са тумором концентрација CEA у првом, 7., и 14. дану туморогенезе није била мерљива.

У мозгу пацова са експерименталним тумором концентрација CEA 7., 14. и 21. дана туморогенезе показује значајан пораст у односу на контролне вредности ( $p < 0,001$ ), док 31. дана опада, али је и даље знатно већа од контролних вредности.

У узорцима хуманог анапластичног астроцитомом концентрација АФР је износила 0,78 и 3,56 ng/ml, док у ткиву глиобластома нису добијене мерљиве вредности овог маркера.

Концентрација CEA у ткиву мозга са анапластичним астроцитомом су износиле 66,9 и 282 ng/ml, а у глиобластома вредности овог антигена била је 53,92 ng/ml.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Andrew H, Edward R: Historical perspective, Brain Tumors. 1995
2. Tatarinov Y. S. Detection of Embryospecific Alpha-Globulin in the Blood Sera of Patients with primary Liver tumor. Vopr. Med. Klim. 1964, 10-90-1 1964.
3. Bosl G. J. H. Lange, E. E. Fraley, A. Goldman, L. E. Nochomovitz I.J. Rosai, Cancer, 47, 328, 1984.
4. Wepsic H. T., Alfa-fetoprotein: Its Quantitation and Relationship to Neoplastic Disease, u Alfa-fetoprotein, laboratory Procedures and clinical Applications, A. Kirkpatrick I R. Nacamura, Edits, massom Publishing, New York, 1981 str. 115.